

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUAR DISMINUCIÓN DE LA FIBROSIS HEPÁTICA EN UN MODELO CON CIRROSIS EXPERIMENTAL MEDIANTE LA MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS ENDOGÉNAS (HSC) INDUCIDA CON FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIA DE GRANULOCITOS (G-CSF) Y/O ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (MSC)

Por

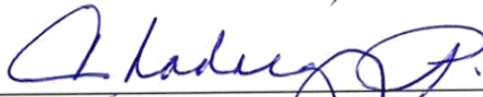
M.C. MARCELA MAGDALENA DE LUNA SALDÍVAR

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

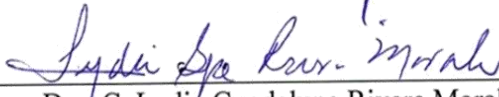
DICIEMBRE 2019

**EVALUAR DISMINUCIÓN DE LA FIBROSIS HEPÁTICA EN UN MODELO
CON CIRROSIS EXPERIMENTAL MEDIANTE LA MOVILIZACIÓN DE
CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS ENDOGÉNAS (HSC) INDUCIDA
CON FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIA DE GRANULOCITOS (G-CSF)
Y/O ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO**

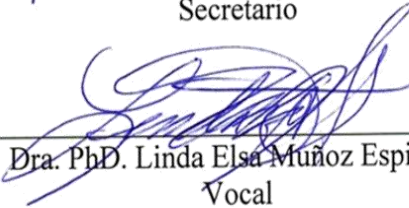
Comité de Tesis



Dra. C. María Cristina Rodríguez Padilla
Presidente



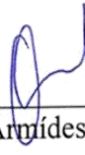
Dra. C. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Secretario



Dra. PhD. Linda Elsa Muñoz Espinosa
Vocal



Dra. C. Paula Cordero Pérez
Vocal



Dr. C. Moisés Armides Franco Molina
Vocal

**EVALUAR DISMINUCION DE LA FIBROSIS HEPATICA EN UN
MODELO CON CIRROSIS EXPERIMENTAL MEDIANTE LA
MOVILIZACION DE CELULAS MADRE HEMATOPOYETICAS
ENDOGENAS (HSC) INDUCIDA CON FACTOR ESTIMULANTE DE
COLONIA DE GRANULOCITOS (G- CSF) Y/O ADMINISTRACION
INTRAVENOSA DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO (MSC)**

Dirección de Tesis



Dra. C. María Cristina Rodríguez Padilla
Director interno



Dra. PhD. Linda Elsa Muñoz Espinosa
Director externo

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y permitirme realizarme.

A mis padres Homero y Malena, quienes me han apoyado siempre y sin ellos esto hubiera sido aún más difícil, gracias por su amor, apoyo, comprensión, cuidados, cuidarme a mi bebe mientras estaba realizando este proyecto. Gracias por la familia que formaron de la cual soy parte y estoy más que agradecida con Dios por haberme premiado con ustedes como padres. Papá estarás aquí, siempre presente en cada momento en cada decisión. Gracias por haber sido esa persona tan noble, generosa, y siempre haber tenido las palabras para hacernos reír, gracias por todos tus consejos y siempre contar contigo, no tienes idea la falta que nos haces, te extraño muchísimo. Mamá gracias por darnos esa fuerza, eres una gran persona un gran ejemplo a seguir, gracias por siempre estar ahí cuando te necesitamos por estar siempre con palabras adecuadas y escucharnos, ser una madre amorosa, bondadosa, cariñosa y considerada. A los dos les tengo una gran admiración. Los quiero con todo mi corazón.

A mis hermanos Ale y Homerito por siempre estar presentes darme ese apoyo incondicional y ayuda constante, por tener esa gran unión que te hace fuerte, no tengo palabras para darles las gracias. Ustedes le dan sentido a la palabra hermano. Siempre estaremos los tres para los tres. Los quiero muchísimo.

A mi hijo Pablo Damián por haberme dado esa fuerza para realizarme en éste proyecto, por esos momentos de juegos que con una sonrisa, beso y abrazo son suficientes para recargar energía y saber que lo que estás haciendo vale la pena. Te quiero muchísimo mi corazón pavito.

A mi esposo Alejandro no fue sencillo culminar éste proyecto, sin embargo, tú fuiste muy motivador y me ayudaste siempre a seguir, gracias por darme tu apoyo, paciencia y comprensión y por estar a mi lado corazón. Te amo muchísimo mi amor.

A la Dra. Cristina por la gran oportunidad de conocerla, brindarme su apoyo académico, emocional y para lo requerido en éste proyecto, tenerme siempre paciencia y escucharme. Gracias por darme la oportunidad y confianza de haber formado parte de su laboratorio.

A la Dra. Linda por haber sido mi mentora, y darme la oportunidad de realizar éste proyecto bajo su dirección, tenerme la confianza para realizarlo, haber sido un gran apoyo durante éstos 3 años, gracias por todas las experiencias vividas.

A la Dra. Paula por darme la oportunidad de realizar este proyecto, experiencias vividas y aprendizaje académico.

A la Dra. Lydia, Dr. Moisés, Dr. Iván, Dra. Gaby por formar parte de éste proyecto y haberlos encontrado a ustedes en el camino siendo unas excelentes personas y haber tenido su apoyo y asesoría, agradezco la oportunidad de haberlos conocido.

A todos y cada uno de las personas que conocí en el LIV, CIDICS, Patología, Unidad de Hígado y que me ayudaron durante la realización de éste proyecto.

A Conacyt por apoyarme con la beca durante estos años.

DEDICATORIA

A mi padre Dr. Pablo Homero De Luna López

A mi madre Profa. y Lic. María Magdalena Saldívar de De Luna.

A mis hermanos Dra. Alejandra Paola De Luna Saldívar y M.B.A. Norberto Homero De
Luna Saldívar

A mi hijo Pablo Damián

A mi esposo Arq. José Alejandro De Hoyos Morales

Ustedes son el motor de mi vida.

En especial lo dedico a mi padre por haber sido un gran ejemplo, deseo enormemente que estés aquí para compartir éste gran logro contigo. Sabes que todas tus enseñanzas siempre se quedarán y tu amor siempre vivirá en nuestros corazones.

“Hay quienes traen al mundo una luz tan grande... que incluso después de haberse ido esa luz permanece”

Gracias por tanto papá te extraño muchísimo.

Tenemos un ángel en el cielo.

“Las palabras nunca alcanzan, cuando lo que hay que decir desborda el alma”

Julio Cortázar

ÍNDICE

Contenido	Índice
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	iii
ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. El Hígado generalidades, estructura y función	4
2.2. Regeneración hepática	7
2.3.Fisiopatología del hígado	11
2.3.1. Citocinas y cirrosis hepática	13
2.4. Modelo experimental inducido con Tetracloruro de Carbono (CCl₄)	15
2.5.Terapia celular hepática	16
2.5.1. Terapia celular en diversos modelos de daño hepático experimentales	22
III. JUSTIFICACIÓN	26

IV. HIPÓTESIS	27
V. OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
VI. ESTRATEGIA GENERAL	29
VII. METODOLOGÍA	31
7.1. Modelo experimental	31
7.1.1. Experimento 1. Preeliminar	31
7.1.2. Experimento 2. Aumento de Dosis de CCl₄	31
7.1.3. Experimento 3. Dosis de CCl₄ más Pentobarbital 0.3g/L en la bebida.....	31
7.1.4. Experimento 4. Modelo de daño hepático inducido con CCl₄ durante 8 semanas con un esquema de dosis aumentado por semana.....	32
7.2. Obtención de tejido adiposo de rata y aislamiento de células madre mesenquimales	32
7.2.1. Caracterización de las MSC derivadas de tejido graso	33
7.2.2. Análisis de la expresión del receptor CXCR4	34
7.3. Grupos de trabajo	36
7.4.Determinación de enzimas hepáticas	38

7.5.Determinación de citocinas	38
7.6.Determinación de factores de crecimiento HGF y TGF- β	39
7.7.Exámenes histopatológicos	41
7.7.1.Inclusión en parafina	41
7.7.2.Tinción de Hematoxilina y Eosina	41
7.7.3.Tinción tricrómico de Masson	42
7.7.4.Tinción Rojo sirius	42
7.7.5.Inmunohistoquímicas	42
7.8. Fluorescencia de GFP en cortes en fresco	43
7.8.1. Transducción con vector adenoviral	43
7.9. Hibridación fluorescente in situ (FISH)	43
7.10. Análisis estadístico	45
VIII. RESULTADOS	46
8.1. Estandarización del modelo de daño hepático inducido por CCl₄ en ratas Wistar	46
8.1.1. Experimento preliminar dosis 1mL/kg de 10% de CCl₄	46
8.1.2. Aumento de dosis de CCl₄	47
8.1.3. Aumento gradual de dosis de CCl₄ + Pentobarbital 0.3g/L en la bebida	48

8.1.4. CCl ₄ con esquema de dosis aumentado por semana	48
8.2. Células derivadas de tejido adiposo expresan MSC CD90 ⁺ y CD105 ⁺	51
8.2.1. Expresión del receptor CXCR4 en MSC de tejido adiposo	51
8.3. Determinación de población CD34 ⁺	52
8.4. Niveles de transaminasas en suero	53
8.5. Determinación de los cambios séricos de factores de crecimiento: HGF y TGFβ y citocinas: IL1-β, IL6, IL-10 y TNFα	53
8.6. Análisis histopatológico	55
8.7. Actividad proliferativa	57
8.8. Expresión de SDF-1	58
8.9. Reclutamiento de las células madre mesenquimales en dos etapas	59
8.9.1. Reclutamiento MSC marcadas con GFP 3 días post-trasplante	59
8.9.2. Rastreo del cromosoma Y mediante FISH a largo plazo en el modelo experimental	60
IX. DISCUSIÓN	61
X. CONCLUSIONES	67

XI. PERSPECTIVAS	68
XII. BIBLIOGRAFÍA	69
XIII. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	88

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Índice
Tabla 1. Curva estándar para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford	34
Tabla 2. Determinación CD34 ⁺ antes vs después de la movilización en cada grupo experimental	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Índice
Figura 1. Estructura celular del hígado.....	6
Figura 2. Estrategia experimental	29
Figura 3. Aislamiento y obtención de MSC obtenidas de tejido graso	33
Figura 4. Grupos experimentales	38
Figura 5. Anatomía y cortes histológicos de hígado	46
Figura 6. Imagen anatómica e histología a diferentes semanas de establecimiento del daño hepático	47
Figura 7. Imagen anatómica e histológica del hígado con daño hepático	48
Figura 8. Determinación de enzimas hepáticas en el modelo experimental	49
Figura 9. Determinación de factores de crecimiento en el modelo experimental	49
Figura 10. Determinación de citocinas en el modelo experimental	50

Figura 11.	Imágenes anatómicas e histológicas del modelo de daño hepático establecido	50
Figura 12.	Expresión génica de marcadores de MSC	51
Figura 13.	Western blot receptor CXCR4 en MSC	52
Figura 14.	Niveles en suero de transaminasas a las 8 y 16 semanas en los grupos tratados	53
Figura 15.	Niveles de factores de crecimiento a las 8 y 16 semanas en los diferentes grupos de estudio	54
Figura 16.	Niveles de citocinas a las 8 y 16 semanas en los diferentes grupos de estudio	55
Figura 17.	Fotomicrografías de tejido hepático tratado con seguimiento a las 8 y 16 semanas	56
Figura 18.	Cuantificación porcentaje de colágena con tinción rojo sirius a las 8 y 16 semanas	57
Figura 19.	Inmunohistoquímica de PCNA en tejido hepático a las 8 y 16 semanas	57
Figura 20.	Inmunohistoquímica de SDF-1 en tejido hepático 8 y 16 semanas	58
Figura 21.	Reclutamiento MSC-GFP 3 días post-trasplante	59
Figura 22.	Rastreo del cromosoma Y mediante FISH	60

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADV	Adenovirus
AFP	Alfa feto proteína
AT	Tejido adiposo
ALT	Alanino aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
ALB	Albúmina
BT	Bilirrubina total
CCl₄	Tetracloruro de carbono
CCl₃	Tricloro metilo
CMV	Citomegalovirus
CO₂	Dióxido de carbono
CXCR4	Receptor de quimiocina CXC tipo 4
DNA	Acido desoxirribonucleico
DMEM	Medio modificado eagle dubbeco
FBS	Suero bovino fetal
FISH	Hibridación fluorescente in situ
G-CSF	Factor estimulante de colonia de granulocitos
GFP	Proteína verde fluorescente
HAI	Hepatitis autoinmune
HSC	Células madre hematopoyéticas
HSCA	Células madre hematopoyéticas autólogas
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HyE	Hematoxilina y Eosina
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1
INF-γ	Interferón gamma
MARS	Sistema de recirculación molecular absorbente

MELD	Modelo de enfermedad hepática terminal
mL	Mililitros
MMP-9	Metaloproteinasa-9
MSC	Células madre mesenquimales
MOI	Unidad de multiplicidad de fluorescencia
RS	Rojo de Sirius
SSC	Buffer salino de citrato de sodio
SDF-1	Factor derivado de estroma 1
TBST	Buffer solución salina Tris-Tween
TGF-β	Factor transformante beta
TM	Tricrómico de Masson
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TP	Tiempo de protrombina
PBS	Solución salina de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
pg	Picogramos
PIIIP	Pro colágena III
PPAR-α	Receptor activado de proliferación de peroxisomas
UI	Unidades Internacionales
VHB	Virus de hepatitis B
μL	Microlitros

RESUMEN

La inflamación crónica del hígado puede conllevar a una cirrosis hepática. Ésta condición limita la capacidad regenerativa del hígado. En estos casos, el tratamiento habitual es el trasplante de hígado. Sin embargo se ha demostrado que el trasplante de células madre mesenquimales (MSC) de tejido adiposo (AT) y la movilización de células madre hematopoyéticas (HSC) mediante el uso de factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF) reparan el daño hepático en modelos de cirrosis. Nosotros proponemos inducir la movilización de células madre hematopoyéticas endógenas (HSC) con factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y / o administración intravenosa de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (MSC) para disminuir la fibrosis hepática en un modelo experimental.

Encontramos que al administrar los tratamientos de forma independiente MSC y G-CSF los niveles de alanina amino transferasa (ALT) disminuyeron y en el caso de la aspartato aminotransferasa (AST) en los tres grupos tratados. El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y la interleucina-10 (IL-10) se encontraron incrementados en el grupo tratado con MSC seguido por el grupo G-CSF + MSC y G-CSF. El factor transformante beta ($TGF-\beta$) se encontró disminuido en el grupo MSC. La interleucina 1 beta ($IL-1\beta$) y el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$) se encontraron disminuidos en todos los grupos tratados. El análisis histológico mostró una disminución de la fibrosis en todos los grupos tratados. Sin embargo, al analizar la expresión en tejido del antígeno de proliferación celular (PCNA) se observó un incremento en el grupo tratado con MSC seguido por el grupo G-CSF y por último el tratado con G-CSF + MSC. El factor derivado de estroma 1 (SDF-1) se encontró disminuido en los grupos tratados con terapia independiente MSC y G-CSF. Al evaluar el reclutamiento de las MSC marcadas con proteína verde fluorescente (GFP) 3 días post-trasplante de MSC, se observaron en el tejido hepático. A los 2 meses de seguimiento post-trasplante rastreamos el cromosoma Y mediante hibridación in situ (FISH) y se encontró presencia de las células en el tejido hepático en mayor presencia en el grupo MSC seguido por el grupo G-CSF + MSC. Con nuestros resultados concluimos que el tratamiento con MSC mostró un mayor potencial de disminuir enzimas hepáticas, citocinas pro-inflamatorias ($IL-1\beta$, $TNF-\alpha$), $TGF-\beta$, fibrosis e incrementó el HGF, IL-10 y expresión de PCNA; seguido por el tratamiento con G-CSF

y por último G-CSF + MSC.

ABSTRACT

Chronic inflammation of the liver may lead to hepatic cirrhosis. This condition limits the regenerative capacity of the organ. In these cases, the usual treatment is liver transplant, however, transplant of mesenchymal stem cells (MSCs) obtained from adipose tissue (AT) and mobilization of hematopoietic stem cells (HSCs) has been shown to repair liver damage in cirrhosis models. We propose induce endogenous hematopoietic stem cells (HSCs) with granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) and/or intravenous administration of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (MSCs) to decrease hepatic fibrosis in an experimental model. We found that treatment only with MSC and G-CSF significantly improved the levels of alanine amine transferase (ALT) and that treatment with G-CSF, MSC and G-CSF + MSC decreased aspartate amine transferase levels. The hepatocyte growth factor (HGF) and the interleukin 10 (IL-10) were increased with MSC treatment, followed by G-CSF + MSC and G-CSF. The transforming growth factor beta (TGF- β) was found decreases in the group treated with MSC. The interleukin 1beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF α) were decreased in all the treated groups. Hystological analysis showed showed reduced fibrosis in all the treated groups. However, the expression analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was increased in the MSC treatment followed by G-CSF and G-CSF + MSC. The stromal cell derived factor 1 (SDF-1) was found decreased in the groups treated with only MSC and G-CSF. When evaluating the recruitment of MSCs labeled with green fluorescent proprotein (GFP) 3 days post-trasplant of MSC, they were observed in hepatic tissue. At the 2 month post-trasplant follow up, we screened the Y chromosome by In situ hybridization (FISH) and we found the presence of cell in the liver tissue in greater presence in the MSC group followed by the G-CSF + MSC group. Our results we conclude that MSC treatment showed a greater potential to decreases hepatic enzymes, pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α), TGF- β , fibrosis and increased HGF, IL-10 and PCNA expression. Followed by treatment with G-CSF and finally G-CSF + MSC.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La enfermedad crónica del hígado ocupa el quinto lugar como causa de muerte en nuestro país. Las enfermedades hepáticas son causadas principalmente por consumo excesivo de alcohol, infecciones por virus de hepatitis B y C, esteatohepatitis no alcohólica, desordenes de tipo autoinmune, químicos o tóxicos (García, 2001, Muñoz et al 1999, Méndez et al. 2005). Los virus de hepatitis producen un estado inflamatorio de tipo agudo, si este persiste se produce la fibrosis hepática que es reversible, caracterizada por acumulación de proteínas de la matriz extracelular especialmente colágeno tipo I y III, así como de proteoglucanos, fibronectina y laminina, como consecuencia, ocurre la activación de las células estelares las cuales son reguladas por citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y productos de estrés oxidativo, sin embargo si no es resuelto, el siguiente estado es la cirrosis, proceso con menores posibilidades de ser reversible, en donde hay diseminación de la fibrosis y formación de nódulos de regeneración, una de las consecuencias es el carcinoma hepatocelular siendo la única alternativa de tratamiento el trasplante hepático (Friedman, 2003, Kershenovich y Weissbrod, 2003). La cirrosis hepática por virus C es la indicación más frecuente para realizar el trasplante hepático ortotópico en adultos, en niños es la cirrosis hepática secundaria a atresia de vías biliares. (Cura, 2007). El objetivo fundamental del trasplante hepático es prolongar y mejorar la calidad de vida de los pacientes con enfermedades hepáticas agudas y crónicas irreversibles. El trasplante hepático constituye el tratamiento de elección en una gran cantidad de enfermedades terminales. Existe una gran desigualdad entre el elevado número de candidatos potenciales a ser trasplantados y la relativamente escasa cantidad de donadores de órganos, con esta desproporción así como el alto costo, dificultan su aplicación en los pacientes con enfermedad hepática con mal pronóstico (Escobedo, 2007).

En un estudio realizado en el año 2005, se describe un análisis de estimación de la tendencia en la prevalencia de las enfermedades hepáticas del 2005 al 2050 en México. En este estudio se utilizaron los datos nacionales de mortalidad reportados en el 2002 por la Secretaría de Salud. La mortalidad-cause fue calculada por edad (\geq a 25 años) y clasificada por sexo de acuerdo al Consejo Nacional de Población. Las causas de muerte

relacionadas a las enfermedades hepáticas fueron colectadas de acuerdo con la Clasificación Internacional de las Enfermedades en su décima revisión. Incluyéndose enfermedad hepática no alcohólica y cirrosis, enfermedad hepática por alcohol, hepatocarcinoma, hepatitis B y C aguda y crónica. El análisis de la tendencia muestra que la causa de prevalencia más importante de enfermedad hepática en el hombre será la enfermedad hepática por alcohol (866848 casos) y en la mujer será la cirrosis no alcohólica (291159 casos) (Méndez et al. 2005).

La posibilidad de aplicar estrategias similares a las que de forma natural usa el organismo para la renovación de las células en un tejido dañado es la idea central que subyace detrás del concepto de terapia celular (Bonora et al. 2008). La terapia celular está condicionada por la accesibilidad de los tipos celulares apropiados para este fin. La capacidad de las células madre de multiplicarse, diferenciarse a diversos tipos celulares específicos, en función del entorno y estímulos que reciban, nos hace creer que son un recurso potencialmente inagotable de células utilizables para trasplante celular (Bonora et al. 2008). En los últimos años, el trasplante de células madre ha brindado una nueva opción terapéutica de tratamiento en diferentes modalidades de terapia celular. Las células madre mesenquimales de tejido adiposo ciertamente se sabe que expresan marcadores de superficie como CD90⁺, CD105⁺, CD73⁺ y CD45⁻ éstas células poseen la capacidad de diferenciarse a linajes osteogénicos, adipogénicos, miogénicos y condriogénicos (Kern et al. 2006). Recientemente se ha publicado que el tejido adiposo posee altos niveles de CXCR4 y se sabe que este receptor juega un papel muy importante en el rol de migración celular (Haddad et al. 2013) el ligando de este receptor de quimiocinas CXCR4 es el factor derivado del estroma (SDF-1) el cual puede también estar involucrado en la anidación de células hacia el hígado. Se ha demostrado aumento de la expresión hepática de SDF-1 en daño hepático: incluyendo hepatitis C (Kollet et al. 2003, Shimoda et al. 1998, Terada et al. 2003); cirrosis biliar primaria; hepatitis autoinmune; y toxicidad por paracetamol (Terada et al. 2003), hepatitis alcohólica. SDF-1 es necesaria para la acumulación de células ovas, Gilchrist et al. También señalan que al recibir el hígado una lesión hepática crónica, la capacidad proliferativa de los hepatocitos se deteriora, de ésta manera el hígado requiere otro mecanismo para regenerar y recuperar

su función. En los roedores las células ovales son activadas y asumen la reparación del daño hepático diferenciándose a células maduras (Itoh y Miyajima et al. 2014).

Existen evidencias de que las células madre hematopoyéticas pueden contribuir a la regeneración hepática durante la falla hepática aguda (Bonora et al. 2008). Los mecanismos de regeneración hepática después del daño agudo al hígado son bien entendidos, la división mitótica de los hepatocitos regeneran con prontitud la masa hepática y su función (Michalopoulos y DeFrances 1997). Cuando estos mecanismos son bloqueados o inadecuados las HSC provenientes de médula ósea participan en la recuperación (Petersen et al. 1999). Las HSC son caracterizadas por poseer un marcador de superficie denominado $CD34^{+}$ (Simmons et al. 1991). Han reportado que los niveles de HSC $CD34^{+}$ incrementan en circulación periférica después de una resección hepática (De Silvestro et al. 2003). Ciertamente se cree que estos mecanismos pueden contribuir a la recuperación hepática sin embargo, en algunas circunstancias estos mecanismos son insuficientes para recobrar las funciones de un daño hepático severo (Mark et al. 2010). Mediante la movilización farmacológica de HSC con el G-CSF resulta un incremento en circulación periférica de un alto número de células madre $CD34^{+}$ las cuales migran hacia donde se encuentre en el daño (Dar et al. 2006). Los protocolos de movilización de HSC han sido desarrollados y optimizados en el trasplante autólogo de médula ósea, pero todavía no son considerados como tratamiento para el daño hepático, donde pueden ser de beneficio (Mark et al. 2010). Es por eso que en el presente trabajo se pretende hacer una evaluación de la repoblación de las MSC de tejido adiposo así mismo comparar con otro tipo de terapia celular que es la movilización de HSC y evaluar su efecto sinérgico ó aditivo en la recuperación del daño hepático avanzado inducido por CCl_4 y brindarle una opción terapéutica accesible en cuanto costo, menos invasiva y mejora en su calidad de vida y salud.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1. El Hígado generalidades, estructura y función.

El hígado es el órgano más grande del organismo, con peso que oscila entre 1 y 1.5 kg, por lo que representa de 1.5 a 2.5 % de la masa corporal magra, el cual está dividido en cuatro lóbulos. El hígado se divide en cuatro lóbulos el derecho e izquierdo los cuales están separados por el ligamento falciforme. Estos lóbulos son suministrados por las ramas derecha e izquierdas de la arteria hepática y la vena porta. La bilis se drena desde el hígado por los conductos hepáticos izquierdos y derecho. El lóbulo derecho se divide en dos lóbulos pequeños: el cuadrado y el caudado (Muriel et al. 2007).

El hígado se localiza en el cuadrante superior derecho del abdomen, por debajo de la caja costal derecha y apoyado sobre el diafragma, proyectándose de forma variable en el cuadrante superior izquierdo. Es mantenido en posición por las fijaciones ligamentarias a diafragma, peritoneo, grandes vasos y órganos gastrointestinales superiores. Recibe un doble aporte sanguíneo: alrededor de 20% del flujo sanguíneo es sangre rica en oxígeno procedente de la arteria hepática y 80% es sangre rica en nutrientes que proviene de la vena porta que se origina en estómago, intestino, páncreas y bazo (Kasper et al. 2005). Gran parte de las células del hígado son hepatocitos, que constituyen dos tercios de la masa hepática. El resto de la celularidad esta compuesta por células de Kupffer (miembros del sistema reticulo endotelial), células estrelladas, células endoteliales y vasos sanguíneos, células de conductillos biliares y estructuras de soporte (Kasper et al. 2005). La unidad estructural y funcional del parénquima hepático es el acino, el cual está construido alrededor del tracto portal y la vena central. Está formado por seis grupos de tractos portales, cada uno con una vénula portal, una arteriola hepática y un ducto biliar, ubicados alrededor de la vena central. La sangre fluye desde las vénulas portales y las arteriolas hepáticas, en el tracto portal, a través de los sinusoides que rodean las placas de hepatocitos, hasta la vena central. Desde el punto de vista celular, el hígado está compuesto fundamentalmente por células epiteliales, entre las cuales los hepatocitos

constituyen la fracción más abundante, y una fracción menor, que corresponde a las células que forman los ductos y dúctulos biliares. Los hepatocitos están organizados en placas del espesor de una sola célula, y de 0.3-0.5 mm de longitud, conteniendo hasta 20 células. Las placas están rodeadas a ambos lados por endotelio sinusoidal. Los hepatocitos muestran marcadas diferencias morfológicas, bioquímicas y funcionales, según su localización en las placas. Son más pequeños cerca del tracto portal, y van aumentando en su tamaño, cuanto más cerca están de la vena central. También hay variaciones en los patrones de expresión de genes dentro del acino, como así también en la ploidía y el potencial de crecimiento. Los hepatocitos y las células epiteliales del ducto biliar tienen un origen embriológico común, a partir de una célula fundadora: el hepatoblasto, que a su vez deriva de células endodérmicas multipotenciales encontradas en el divertículo hepático, que aparece como un engrosamiento del intestino anterior adyacente al corazón en desarrollo y proyectándose en el septo transversal (Lorenti 2001). El desarrollo del hígado a partir del divertículo depende de interacciones entre las células endodérmicas y el mesodermo que las rodea. Esta interacción es indispensable para la formación del hígado. Los hepatoblastos (bipotenciales) migran a través del septo transversal, y comienzan a diferenciarse, regulados por las señales que reciben del mesénquima portal: los hepatoblastos que no están en contacto con el mesénquima portal se diferencian en hepatocitos, y en el caso de las células que están en contacto con el mesénquima del tracto portal, se diferencian en células ductales biliares (Grisham et al. 1997).

Los hepatocitos cercanos al tracto portal son diploides y muestran el mayor potencial de crecimiento. En la zona intermedia, entre el tracto portal y la vena central, son tetraploides y con capacidad de crecimiento intermedia. Cerca de la vena central son tetraploides u octaploides, y su capacidad de crecimiento es mucho menor. Un modelo de explicación para este tipo de patrón celular, tiene que ver con la maduración celular, en la cual las células progenitoras están localizadas en, o están muy cercanas a los ductos biliares o canales de Hering, también conocidos como colangiololes, y van sufriendo un proceso de diferenciación terminal unidireccional que termina en la vena central (Fausto, 1994), en la Figura 2 se muestra la estructura celular del hígado.

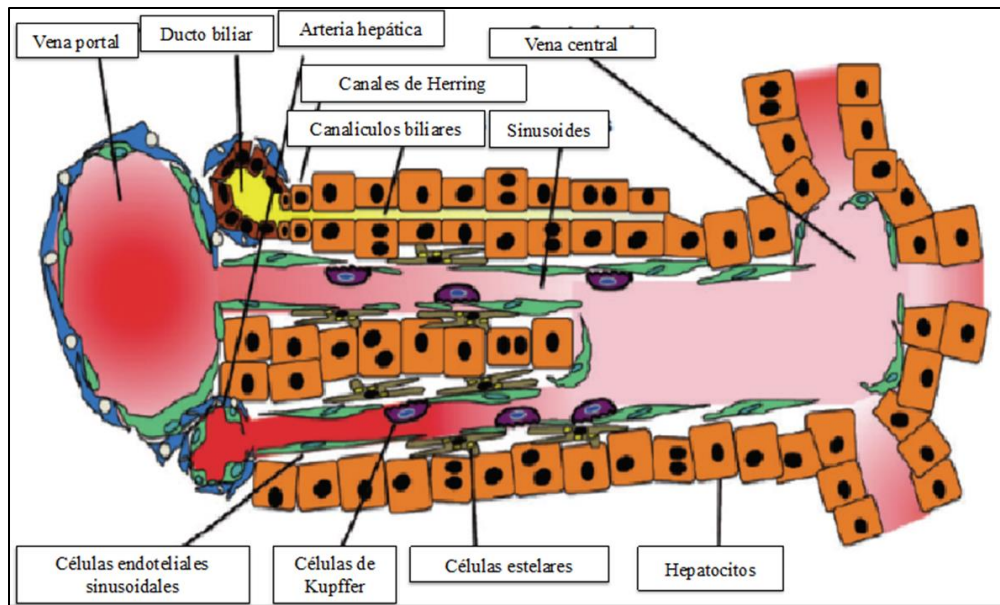


Figura 1. Estructura celular del hígado. En el hígado, la sangre fluye de los vasos sanguíneos portales a través de los sinusoides a las venas eferentes centrales. Sinusoides son capilares específicos del hígado con células endoteliales, células estrelladas y células sanguíneas como macrófagos residentes del hígado. Los hepatocitos son células epiteliales altamente polarizadas formando cordones y las placas de hepatocitos (tomada Tanaka et al., 2011).

Las funciones más importantes del hígado consisten en proveer de combustible metabólico a diversos tejidos durante los períodos de ayuno, esto es, proporcionar glucosa, aminoácidos y cuerpos cetónicos; remover de la sangre productos de deshecho originados en otros tejidos para convertirlos en otros combustibles metabólicos o en compuestos de excreción urinaria o fecal; sintetizar componentes estructurales para otros tejidos y destoxificar biológicamente compuestos activos como fármacos, hormonas, venenos. El metabolismo de la glucosa y los lípidos por parte del hígado es un proceso de importancia capital en la regulación de los sustratos energéticos en el cuerpo humano. Es necesaria una función hepática suficiente para permitir un adecuado tránsito por las tres situaciones metabólicas que se viven. El hígado no sólo cubre sus requerimientos energéticos en estos tres estados sino que, además, provee el resto de los tejidos de los sustratos requeridos (Méndez y Uribe 2003).

El hígado desempeña una función central en el metabolismo de las proteínas del organismo humano, en forma tan importante como lo hace con el metabolismo de los lípidos. Su participación se reconoce en muchas fases del metabolismo y se aprecia con mayor facilidad cuando el hígado se extrae con fines experimentales o en situaciones en

las que sus funciones se comprometen de manera seria por enfermedades agudas o crónicas (Méndez y Uribe 2003).

2.2. Regeneración hepática

El hígado tiene la capacidad de regenerarse tras una agresión o resección. Cualquiera de las técnicas de trasplante hepático de tamaño reducido también lleva asociada una regeneración post-trasplante del injerto. La capacidad de regeneración del hígado cuando sufre una lesión o una resección quirúrgica no deja de sorprender ya que éste es un órgano quiescente, en términos de proliferación celular, en el cual solamente menos del 0.01% de los hepatocitos se están dividiendo en un momento determinado (Koniaris et al. 2003).

El hígado dañado expresa citocinas y quimioattractantes como el SDF-1, éstos factores pueden facilitar la anidación de células progenitoras extrahepáticas (Hatch et al. 2002 y Thiese et al. 2003). Es posible que la gran capacidad de regeneración que el hígado posee este de alguna manera relacionada con la presencia de los nichos de células madre y/o progenitoras (ovales), ya que se ha visto en necrosis hepática masiva que las células epiteliales que contienen doble expresión de conductos biliares así como marcadores de hepatocitos fetales, pueden corresponder a células madre facultativas (Shafritz et al. 2002 y Roskams et al. 2003). El nombre, células ovales, surge de observaciones hechas en trabajos en roedores, en los que se visualizaron como células de forma oval, conteniendo un núcleo ovalado, y una alta relación núcleo-citoplasma. El concepto de células ovales comenzó a ganar importancia a partir de estudios de carcinogénesis. Ratas expuestas a un amplio rango de carcinógenos muestran un patrón marcadamente uniforme de cambios, que terminan en el desarrollo de un carcinoma hepatocelular: necrosis diseminada e inflamación, seguidas por la proliferación de hepatocitos. Concomitantemente, comienza, en la zona del tracto portal, la proliferación de células pequeñas, de citoplasma escaso, núcleo ovoide: las células ovales. El análisis del desarrollo del hígado y los estudios de poblaciones celulares durante la carcinogénesis, proveyeron los elementos para localizar estas células progenitoras en los canales de Hering en el hígado adulto normal (Theisse et al. 1999). Las células ovales se originan en esta región, e invaden el parénquima completo. A medida que ellas proliferan aparecen

pequeños núcleos de hepatocitos pequeños, altamente basófilos entre ellas. Las células ovales van desapareciendo en la medida que el parénquima es gradualmente reconstruido (Lorenti et al. 2001). Las células ovales en proliferación comprenden un grupo heterogéneo de poblaciones, por lo cual se lo ha llamado “compartimiento de células ovales” (Fausto et al. 1994). Este compartimiento, además de las células ovales, contiene células en transición, que fueron identificadas por características morfológicas, como intermedias entre células ovales y hepatocitos, como también células con características de ductales biliares, y una variedad de células mesenquimales. Algunas células ovales expresan marcadores antigénicos característicos de células progenitoras, así como otros típicos de los hepatocitos y del epitelio biliar adulto. Específicamente las células ovales expresan algunos marcadores de las células epiteliales del hígado fetal, incluyendo citoqueratinas 7 y 19, alfa-fetoproteína, débilmente albúmina, y OV-6. Usando estos anticuerpos (OC2 y OC3), se han identificado, en hígados normales, poblaciones de células antigénicamente relacionadas a células ovales. Estos antígenos, así como otros determinantes antigénicos de superficie, son compartidos entre las células ovales y las células progenitoras hemopoyéticas, incluyendo c-kit, CD34 y Thy-1 en roedores, y c-kit y CD34 en humanos (Baumann et al. 1999; Lemmer et al. 1998; Omori et al. 1997; Petersen et al. 1997)

Más aún, se han identificado células ovales en hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular e hígado cirrótico humanos, mediante marcadores originalmente demostrados en células ovales de rata, incluyendo OV-6. Usando técnicas de doble marcación, se demostró que algunas de estas células co-expresaban marcadores fenotípicos hepatocitarios o biliares (Baumann et al. 1999; Crosby et al. 1998).

Las células estelares juegan un papel importante en la remodelación del tejido hepático en hepatopatías (Burra et al. 2004), la inflamación, las infecciones y otros procesos pueden dañar el estroma hepático y en respuesta a éste proceso las células capaces de producir componentes de matriz extracelular son reclutadas. El estroma se regenera después de hepatectomía parcial, en asociación con células parenquimatosas y activación de las células progenitoras durante el daño hepático. Durante la remodelación hepática hay liberación de citocinas de las células estelares; las células de Kupffer y las células

endoteliales regulan la diferenciación de las células ovas en hepatocitos (Burra et al. 2004).

Una lesión hepática o una resección quirúrgica resulta en una proliferación masiva de los hepatocitos supervivientes y cesa cuando la masa del hígado llega a representar una fracción determinada del peso del individuo, que varía con la edad y con la especie (Koniaris et al. 2003), por ejemplo si se extrae el 40% del órgano, el donante recupera la masa perdida a los seis meses. Aunque los hepatocitos son los primeros en proliferar todos los tipos celulares hepáticos se dividen, desde las células epiteliales biliares, las células endoteliales, hasta las células de Kupffer (Michalopoulos y DeFrances, 1997). La cinética de proliferación celular difiere entre especies. Inmediatamente después del estímulo regenerativo, los hepatocitos salen del estado G_0 para entrar en la fase G_1 , dividen su DNA en la fase S y entran en mitosis (fase M), llegando al pico de regeneración a las 24 horas en el caso de las ratas y existe un segundo pico menor entre las 36 y las 48 horas. Los demás tipos celulares del hígado entran en división 24 horas después de los hepatocitos (Koniaris et al. 2003; Michalopoulos y DeFrances, 1997; Taub, 2004).

Se sabe que existen dos mecanismos de regeneración hepática (Kholodenko et al. 2017) uno de ellos es la hiperplasia compensatoria de los hepatocitos y otro es la regeneración mediada por células madre / progenitoras. Eventos celulares y moleculares que tienen lugar durante la hiperplasia compensatoria están relativamente bien caracterizados, según el autor Nelson Fausto se puede dividir en dos etapas: 1) Iniciación: la salida del hepatocito de la fase quiescente para entrar en el ciclo celular, 2) Progresión: a través del punto de restricción en la fase G_1 del ciclo. Este autor propone que estas etapas tienen un control independiente, en la iniciación intervendrían las citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$), la interleucina- 1 (IL-1), la interleucina 6 (IL-6) y en la progresión los factores de crecimiento, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$) (Fausto, 2002). Las células no parenquimatosas del hígado tienen una función importante como fuente de factores de crecimiento e interleucinas que promueven e inhiben la proliferación de los hepatocitos; aunque se desconoce el papel individual de cada población. Las células no parenquimatosas que forman parte de la arquitectura del hígado tienen un papel

importante en la liberación de todas estas moléculas. Las células de Kupffer son responsables tanto de la producción y liberación de las citocinas proliferativas TNF- α e IL-6, como de las anti-proliferativas IL-1 y TGF- β . Las células endoteliales de los sinusoides, aunque no son la fuente mayoritaria de citocinas, son capaces de generar TGF- β , HGF e IL-6. Las células estrelladas hepáticas sintetizan y liberan HGF y TGF- β (Malik et al. 2002; Taub, 2004).

Mientras que la regeneración alternativa mediada por células madre no ha sido completamente revelado aún (Verhulst et al. 2015, Prockop et al. 1997, Petersen et al. 1999, Williamson et al. 2000). Sin embargo, se piensa que las células progenitoras del hígado actúan en el proceso de regeneración después de una necrosis masiva del tejido hepático causado por una agresión tóxica u otras razones, cuando la capacidad de proliferación de los hepatocitos está limitada. Éstas células progenitoras residen en los conductos y canales de Hering, y se consideran un material atractivo de partida para la terapia celular de las enfermedades hepáticas (Cantz et al. 2008, Grompe, 2014, Lu et al. 2015).

El agotamiento de los compartimentos de las células ovals en el hígado conlleva al desarrollo de insuficiencia hepática en las hepatopatías crónicas. Los nichos de células ovals en los canales de Hering son las células progenitoras hepáticas (Clouston et al. 2009).

Durante el proceso de hepatectomía no existe un daño remanente en el tejido, lo que se considera un modelo limpio para estudiar los mecanismos de regeneración. Sin embargo, éste modelo no recapitula situaciones patológicas en enfermedades hepáticas humanas, en las que cuales se envuelve la muerte de hepatocitos y la inducción concomitante de respuesta inflamatoria y fibrogénica por ejemplo en diviersas condiciones patológicas como la infección crónica de hepatitis, enfermedad hepática alcohólica, esteatosis hepática no alcohólica. Ante estas situaciones se ha encontrado que poblaciones de células epiteliales inmaduras únicas con potencial de diferenciación bilineal surgen y se expanden, éste fenómeno se refiere a la reacción ductular (Fausto, 2004; Roskams et al., 2003; Roskams et al., 2004; Turanyi et al., 2010). Éstas poblaciones de células progrenitoras a menudo se denominan “células progrenitoras hepáticas” ó “células

hepatobiliares intermedias” en seres humanos. El grado de expansión y la reacción dustular se sabe se correlaciona con la gravedad del hígado (Lowes et al., 1999). Lo que implica su papel relevante en la patogénesis hepática y regeneración (Itho et al. 2014).

Algunos investigadores consideran Alunos investigadores consideran tales poblaciones de células progenitoras bipotenciales activadas por enfermedad como "células madre hepáticas". La expresión "células madre hepáticas facultativas" parece ser más precisa, porque estas células pueden identificarse solo bajo una condición limitada en un hombre transitorio (Alison et al., 1996). Por otro lado, algunos también usan la terminología "células madre del hígado" para denotar la célula de origen en el hígado normal para aquellos progenitores activados por enfermedad en el hígado lesionado. Como se discutirá a continuación, la ori-gin de células progenitoras activadas bajo condiciones de enfermedad aún permanece oscura, y no está claro dónde y cómo las células madre hepáticas residentes para la renovación normal del tejido, las células madre hepáticas facultativas en el hígado lesionado, la célula de origen para estas células, así como las células madre potencialmente definidas definidas in vitro son las mismas o diferentes. Además, también se pueden usar otros criterios, en algunos casos, para evaluar y describir las células madre del lúpulo, como la capacidad de repoblar el hígado al trasplante o la retención de la etiqueta a largo plazo (Itho et al. 2014).

2.3. Fisiopatología del hígado

El hígado normal contiene un componente epitelial que corresponde a la parte más abundante, los hepatocitos, una capa de células endoteliales que revisten a los sinusoides, macrófagos tisulares que en el hígado son conocidos como células de Kupffer y células perinsinusoidales que a través del tiempo han recibido diferentes denominaciones, como lipocitos, células estrelladas, células de Ito, células almacenadoras de lípidos o células almacenadoras de vitamina A. Los lipocitos conforman alrededor del 5 al 8% de todas las células del hígado, en condiciones normales almacenan vitamina A y durante el desarrollo de la fibrosis hepática son un elemento clave. Al ser activadas sufren un proceso de metaplasia, lo que las convierte en células parecidas a los miofibroblastos. En condiciones normales, la matriz extracelular da soporte y permite el transporte de sustancias, pero cuando hay daño hepático se altera la composición de esta matriz. Desde

el punto de vista clínico, disminuye la síntesis de albúmina, la desintoxicación de fármacos y la producción de factores de coagulación. Se han identificado diferentes fases en la activación de los lipocitos o células estrelladas (Méndez et al. 2007):

- Etapa preinflamatoria o de reposo: consiste en cambios en la expresión genética y fenotípica que hacen a las células sensibles a citocinas y otros estímulos locales.
- Etapa de perpetuación: es la estimulación autocrina y paracrina que llevan a cabo las células del endotelio sinusoidal, células de Kupffer, hepatocitos, plaquetas y leucocitos. Hay remodelación rápida de la matriz extracelular y amplificación del fenotipo activado mediante la expresión de factor de crecimiento.
- Resolución de la activación de las células estrelladas: las células estrelladas se ocupan de la síntesis y depósito de colágena; diferentes células o factores liberados las sensibilizan y activan intensamente. Dentro de las células que causan cirrosis hepática y se describen a continuación (Méndez et al. 2007):
- Las células endoteliales, que intervienen mediante la producción de fibronectina y conversión del TGF- β en su forma activa.
- Las células de Kupffer, que estimulan la síntesis de la matriz extracelular, la proliferación celular y liberación de retinoides de las células estrelladas, secretan metaloproteínasa 9 (MMP-9), la cual activa el TGF- β al aumentar la síntesis de colágena, generan radicales libres de oxígeno que aumentan la activación de las células estrelladas y producen óxido nítrico, que sirve para balancear la producción de los radicales libres de oxígeno.
- Los neutrófilos son una fuente importante de radicales libres de oxígeno, y éstos ejercen un efecto directo estimulante sobre la síntesis de colágena.
- Los linfocitos T CD4 (colaboradores) producen IL-4, IL-5, IL-6, e IL-13, que favorecen la fibrogénesis.

El estrés oxidativo es un estímulo para la fibrosis. En pacientes con daño hepático por alcohol, la saturación de la vía de la enzima deshidrogenasa de alcohol induce a las enzimas citocromo P-450 (CYP2E1 o CYP4A), lo cual produce radicales libres de oxígeno. La infiltración por leucocitos es un punto clave de la fibrosis hepática. El riesgo de fibrosis se relaciona en proporción directa con la extensión de la inflamación y con el

aumento de las transaminasas. Por otro lado, el TNF α ocasiona fibrosis mediante la estimulación paracrina de las células estrelladas (Méndez et al. 2007).

El receptor activado de proliferación de peroxisomas (PPAR- α) induce CYP4A, lo cual favorece el estrés oxidativo. La pérdida de PPAR- α ocasiona oxidación de ácidos grasos y esteatohepatitis en modelos experimentales. La activación de las células estrelladas se asocia con regulación a la baja de PPAR- γ , pero no de PPAR- α . Algunos plantean que los ligandos del PPAR- γ (tiazolidinedionas como rosiglitazona o tioglitazona) podrían ocasionar beneficios al evitar la activación de las células estrelladas. También se sabe que la leptina induce fibrosis hepática en pacientes con esteatosis. Vale la pena hacer notar que las concentraciones de leptina son directamente proporcionales a la masa adiposa y que las células estrelladas producen leptina. Se considera que el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) es el estímulo más potente para la proliferación de las células estrelladas. Tanto el PDGF como su receptor se regulan en forma positiva después de un daño hepático.

La metaloproteinasa 1 de la matriz es una proteasa que degrada la colágena tipo I, la principal colágena en el hígado con fibrosis. Las células estrelladas producen inhibidores de las metaloproteinasas (TIMP-1 y TIMP-2) y, por lo tanto, determinan un aumento de la fibrosis y cirrosis. La falta de degradación de la matriz cicatrizal contribuye a la progresión de la cirrosis. Durante la recuperación del daño hepático agudo, la cantidad de células estrelladas disminuye porque algunas se desactivan o sufren apoptosis. Por consiguiente, la aparición de cirrosis no tiene que estar relacionada con la necrosis de los hepatocitos o la presencia de virus hepatotrofos (Méndez et al. 2007).

2.3.1. Citocinas y cirrosis hepática

El proceso patológico central de la cirrosis es la fibrosis progresiva. Se ha descrito que el depósito de tejido conectivo es una respuesta cicatrizal anormal a la lesión hepática producida por agentes químicos o infecciosos y que esto trae como consecuencia infiltración de fibroblastos en el parénquima hepático. En el hígado normal las colágenas intersticiales (tipo I y III) se encuentran casi exclusivamente alrededor de los espacios porta y de las venas centrales, mientras que la colágena tipo IV forma fibras muy delicadas alrededor de los espacios de Disse. En cambio, en la cirrosis, las colágenas I y

III se depositan en y a través de los lobulillos hepáticos creando en forma progresiva tabiques irregulares que pueden llegar a ser muy gruesos y que cortan y circundan porciones del lobulillo hepático, para formar lo que se conoce como nódulos de regeneración (Cordero 2007).

En la cirrosis, la mayor parte del exceso de colágena no es producto de los fibroblastos, como se pensaba antes, sino de un tipo de células perisinusoidales conocidas como células hepáticas “estelares” o células de Ito. En condiciones normales, las células estelares no desarrollan una actividad muy relevante además de su función almacenadora de lípidos, pero durante el proceso cirrótico se transforman en células de tipo miofibroblástico y son entonces capaces de producir colágena y numerosas citocinas proinflamatorias que alteran el microambiente hepatocelular (Cordero 2007).

En casos de daño hepático agudo, como en hepatitis víricas que involucionan espontáneamente, las células estelares activadas al inicio entran en un estado latente al regenerarse el parénquima hepático, por lo que no se produce fibrosis. Por el contrario, cuando la lesión hepática continúa, éstas células permanecen siempre activadas y permiten el depósito progresivo de bandas de tejido conectivo intersticial, lo que limita y afecta cada vez más la función hepática. Esto explica como el hígado se torna cada vez más firme y fibrótico y porque la cirrosis es progresiva. Estos conocimientos biomoleculares han permitido idear numerosas estrategias terapéuticas. Unas son preventivas y están orientadas a inhibir la función fibrogénica de las células estelares para evitar la fibrosis consecutiva a lesión hepática; otras están encaminadas a promover la reabsorción de colágena ya depositada en hígados cirróticos. Algunas citocinas como el Interferon gamma (IFN- γ) y el HGF inhiben la activación de células estelares en modelos animales; en la actualidad este interferón se ha comenzado a usar, con buenos resultados, en casos de fibrosis avanzada de hígado en pacientes con hepatitis C persistente. En fecha reciente se cuenta ya con moléculas que son capaces de inhibir a las citocinas estimulantes de proliferación de células estelares, como el PDGF y el TGF- β , que limitan la inhibición de la respuesta proliferativa, fibrogénica y contráctil de las células estelares. Algunos de estos productos ya se encuentran en protocolos de fase clínica III en diferentes enfermedades fibrogénicas como fibrosis pulmonar y cirrosis. Uno de los blancos más buscados para prevenir la formación de tejido cicatrizal en hígado es la

inhibición de la síntesis de colágena. Esto se ha logrado en modelos experimentales por medio de inhibidores de la citocina TGF- β , que es la citocina con mayor actividad fibrogénica (Cordero 2007). Factores de crecimiento tales como el TNF- α , IL-1 β e IL-6 son secretados por células inflamatorias y están involucrados durante el reclutamiento de macrófagos circulantes y en la transición de células estelares a células estelares activadas (De Minicis et al., 2011; Wang et al., 2015).

2.4. Modelo experimental inducido con Tetracloruro de Carbono (CCl₄)

Los modelos de daño hepático pueden aportar herramientas para el estudio de la histopatología. Las lesiones agudas y crónicas hepáticas pueden ser inducidas experimentalmente. Estas incluyen la necrosis, esteatosis, lesiones venulares y cirrosis. Para el estudio de estos modelos se pueden incluir una gran variedad de especies animales. El animal más empleado ha sido la rata por su tamaño y por el bajo costo (Muriel et al. 2007).

La mayoría de la información relacionada al daño del hígado y algunos factores que pueden ser modificadores de la susceptibilidad, tales como edad, sexo y dieta, se aplican a la rata. El uso general de un modelo experimental relativamente uniforme permite la comparación de los resultados de diferentes laboratorios. Existen diversas formas de ocasionar un daño hepático experimental para ocasionar cirrosis o hepatitis tóxica, los inductores más empleados son el paracetamol, alcohol y CCl₄ (Muriel et al. 2007).

En el caso del CCl₄ resulta ser muy útil como modelo experimental para el estudio de ciertos efectos hepatotóxicos, éste produce lesión hepática en muchas especies incluyendo rata, ratón y primates. El CCl₄ induce toxicidad dependiendo de la dosis y tiempo de exposición, cubriendo una variedad de efectos. En dosis bajas, los efectos transitorios que prevalecen, tales como la pérdida de la homeostasis de Ca²⁺, peroxidación de lípidos, liberación de citocinas y eventos de apoptosis seguidos por una regeneración. Otros efectos con altas dosis y mayor tiempo de exposición, son más graves y desarrollan degeneración de grasa, fibrosis, cirrosis e incluso pueden llegar hasta cancer. El metabolismo del CCl₄ empieza con la formación del radical libre triclorometil CCl₃[•] a través de la función mixta del sistema de citocromo P450 oxigenasa de el

retículo endoplasmico. Este proceso envuelve la reducción del enlace carbono-cloro. La activación del radical libre del CCl_4 y contribuye muy significativamente en esta toxicidad. La isozima principal citocromo para ejecutar la biotransformación del CCl_4 es CYP2E1 pero también son capaces de atacar al CCl_4 la CYP2B1 y CYP2B2. El radical CCl_3^{\bullet} reacciona con varias sustancias biológicas importantes como los ácidos grasos, proteínas, ácidos nucleicos y aminoácidos (Muriel et al. 2007).

En 1926 Lamson y Wing fueron los primeros en reportar que la intoxicación por CCl_4 produce cirrosis, tiempo después en 1932 Cameron y Karunaratne publicaron un estudio que establecía la morfología y mostraba las condiciones estándares experimentales del modelo. Hoy en día, la cirrosis inducida mediante la administración del CCl_4 es probablemente la más ampliamente usada como modelo para reproducir la cirrosis en ratas y ratones. Para producir la cirrosis experimental, es necesario administrar repetidas dosis de CCl_4 independientemente del animal y ruta de administración. El tiempo de prolongación entre cada administración no debe prolongarse debido a que el hígado dañado puede recuperarse. La cirrosis es observada después de 2 meses y la severidad de la enfermedad incrementa después de los 3 meses de tratamiento se especula una mortalidad entre el 20 – 30%; después de 4 meses, la mortalidad es muy alta arriba del 80%. La cirrosis establecida por CCl_4 envuelve cambios severos en los órganos abdominales. El hígado frecuentemente esta agrandado; sin embargo, en estadíos avanzados de la enfermedad. Este puede ser más pequeño que el normal con nodularidad. Aumento de la grasa mesentérica e hiperplasia de los ganglios linfáticos ocurren con frecuencia en la cirrosis humana (Muriel et al, 2007).

La cirrosis experimental inducida mediante el CCl_4 parece reproducir las características de la cirrosis humana: manifestaciones nodulares en el hígado, hipertensión portal en la mayoría de los animales y la arquitectura normal es reemplazada por nódulos rodeados por septas de tejido fibrótico con ductos biliares proliferados (Muriel et al. 2007).

Este modelo es el más ampliamente utilizado para reproducir la cirrosis humana en animales experimentales para estudiar los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad y muchos fármacos antifibróticos son probados en este modelo antes de utilizarlos en los seres humanos (Muriel et al. 2007).

2.5. Terapia celular hepática

La posibilidad de aplicar estrategias similares a las que de forma natural usa el organismo para la renovación de las células en un tejido dañado es la idea central que subyace detrás del concepto de terapia celular (Bonora et al. 2008). La terapia celular está condicionada por la accesibilidad de los tipos celulares apropiados para este fin. La capacidad de las células madre de multiplicarse, diferenciarse a diversos tipos celulares específicos, en función del entorno y estímulos que reciban, nos hace creer que son un recurso potencialmente inagotable de células utilizables para trasplante celular (Bonora et al. 2008). En los últimos años, el trasplante de células madre ha brindado una nueva opción terapéutica de tratamiento en diferentes modalidades de terapia celular.

Se ha tratado de establecer los mecanismos responsables de iniciar el proceso complejo de regeneración hepática. Se ha postulado que las células hematopoyéticas progenitoras tienen la capacidad de transdiferenciarse en hepatocitos y células biliares (Thiese et al. 2000, Lagasse et al. 2000, Crosby et al. 2001, Korbiling et al. 2002, Schwartz et al. 2002, Newsome et al. 2003).

Las células hematopoyéticas circulantes contribuyen a la reparación de órganos sólidos como el hígado. Las células progenitoras del sistema hematopoyético adulto podrían potencialmente ser de uso clínico para generar hepatocitos que reemplacen tejido hepático dañado o deficiente (Khan et al. 2008).

Existen diversos linajes celulares dentro del hígado, hay una maduración coordinada entre los componentes epiteliales (células parenquimatosas) y las MSC, existe también una maduración coordinada con algunos componentes de matriz extracelular encontradas en diferentes estadios del linaje celular (Turner et al. 2011).

Otros autores han sugerido que en el hígado se lleva a cabo una fusión, en el rescate de la función (Wang et al. 2003). Existen varias fuentes de células madre tejido-específico, como es la médula ósea como fuente de células madre hematopoyéticas autólogas (HSCA). Por otro lado las MSC podemos obtenerlas de diversas fuentes como cordón umbilical, placenta, fetos, líquido amniótico, médula ósea, tejido adiposo que tienen la capacidad de diferenciarse en variadas líneas celulares (Gilchrist y Plevris, 2010).

Las MSC son células adultas multipotentes, con morfología fibroblastoide y plasticidad hacia diversos linajes celulares como condrocitos, osteocitos y adipocitos, entre otros.

Estas pueden ser aisladas y expandidas en medio de cultivo debido a sus propiedades de adhesión al plástico, diferenciación y proliferación *in vitro* (Jones et al. 2010 y Haniffa et al. 2007). Las MSC como tales deben expresar los antígenos mesenquimales CD73⁺, CD90⁺ y CD105⁺ y no presentar antígenos hematopoyéticos como CD34⁻ y CD45⁻ (Alongi et al. 2007, Macías et al. 2010, Ghannam et al. 2010). Para su obtención los tejidos mayormente empleados son la médula ósea, la sangre del cordón umbilical y el tejido adiposo (Jewett et al. 2010, Kern et al. 2006, Ren et al. 2010). Sin embargo, en cuanto a la relación obtenida de células madre es mucho mayor la proporción encontrada en tejido adiposo por ejemplo de 1 g de tejido adiposo se obtienen 5 x10³ MSC, aproximadamente 500 veces más que en 1 g de médula ósea (Fraser et al. 2006) y en cuanto al aislamiento y cultivo a partir de AT, las células obtenidas tienen una morfología, fenotipo y capacidad de diferenciación similar a la médula ósea pero con mayor potencial de proliferación. (Jewett et al. 2010 y Kern et al. 2006).

El AT deriva de la capa mesodérmica del embrión y tiene desarrollo pre y post natal. La formación de células adiposas en la especie humana tiene lugar durante el segundo trimestre de gestación (Ailhaud y Grimaldi 1992). Se caracterizan por su aspecto fibroblástico que contiene abundante retículo endoplasmático, un alto índice núcleo/citoplasma, localización perinuclear de la mitocondria y la presencia de vacuolas lipídicas (Gimble et al. 2007). Su diferenciación celular procede de la secuencia adipoblasto–preadipocito-adipocito inmaduro-adipocito maduro. En el tejido adiposo los precursores coexisten en conjunto con células adiposas maduras, fibroblastos, células sanguíneas, células endoteliales, pericitos y células mesenquimales indiferenciadas y pobremente diferenciadas, que hoy llamamos MSC (Ailhaud y Grimaldi 1992). Probablemente el progenitor de los adipocitos ha venido desde la médula ósea a través de la circulación (Hausman y Hausman 2006).

Las MSC pueden tener un rol importante en la inmunotolerancia, y han sido utilizadas para tratar la enfermedad injerto vs huésped (Gilchrist y Plevris, 2010).

Existen diversas estrategias para diferenciar a las células madre, una de ellas es trasplantando directamente en el tejido dañado, diferenciación directa mediante técnicas de cultivo celular de mono capa y bidimensionales, exposición a diferentes factores de crecimiento (Kinney et al. 2013)

Estudios realizados por diferentes grupos de investigadores demuestran que la terapia celular resulta ser muy prometedora. En un estudio realizado por Gehling et al. Se reportó que después de una hepatectomía parcial se observó un aumento sustancial de células periféricas CD133⁺ y células mononucleares CD14⁺, no así en cirugías abdominales por otra causa en humanos (Gehling et al. 2005). En éste estudio se demostró que las células CD133⁺ fueron capaces de diferenciarse en linaje de hepatocitos *in vitro*. Las células de la médula ósea se diferencian en células que expresan genes específicos de hígado cuando se cultivan con hepatocitos y con el HGF, confirmando que el HGF regula la diferenciación de las células progenitoras hepáticas (Okumoto et al. 2005).

Los mecanismos que actualmente se discuten sobre la regeneración hepática inducida por células madre son la fusión celular (Wang et al. 2003, Vassilopoulos et al. 2003, Grompe, 2003), la transdiferenciación de estas células en hepatocitos sin fusión (Newsome et al. 2003, Jang et al. 2004) y la regeneración endógena de hepatocitos estimulada por las células madre apoyada por factores tróficos tales como la IL-6 (Aldeguer et al. 2002).

Un reporte sobre un consenso que se llevó a cabo en London en el año 2012 concluye que por ahora el parénquima hepático aislado de donadores de hígado es el mejor recurso para el trasplante, también reportaron que existen otros recursos incluyendo células madre las cuales se están aplicando en estudios preclínicos. Los participantes del consenso concluyeron que es necesario compartir información entre los diferentes grupos de investigación sobre el trasplante de células, control de calidad, criterios de selección y análisis de las células trasplantadas con esto se podría comparar la información entre los procedimientos llevados a cabo por los diferentes centros y conocer la efectividad de sus tratamiento (Puppi et al. 2012).

En un estudio llevaron a cabo el trasplante de células madre fetales derivadas de hígado por la arteria hepática en pacientes con cirrosis hepática, los resultados fueron significativos después del trasplante los pacientes no presentaron episodios de encefalopatía, mostraron una mejoría en los parámetros bioquímicos. El puntaje de MELD disminuyó en los pacientes con una $p < 0.01$, esto en 6 meses de seguimiento (Khan et al. 2010).

En un estudio en el que llevaron a cabo la infusión periférica de células madre hematopoyéticas autólogas (HSCA) en 9 pacientes con cirrosis hepática de etiología viral (virus B y C), los marcadores por citometría de flujo fueron CD34⁺, CD45⁺ y c-kit. Hubo un incremento significativo del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y alfa fetoproteína (AFP) en biopsias hepáticas antes y después de la infusión de HSCA ($p < 0.05$). La cantidad de células infundidas en promedio fue $5.2 \pm 0.63 \times 10^9$. No se observaron efectos indeseables importantes y los pacientes toleraron la anestesia adecuadamente. La clasificación funcional Child-Pugh B fue de 8 a 9 puntos antes del estudio y se mostró mejoría en la síntesis de albúmina. Se midieron la síntesis de péptido pro colágena III (PIIIP) y el HGF basal a las 4 y 24 semanas, mostrando disminución del PIIIP, así como aumento del HGF, sin embargo no fue significativo. Este estudio sugiere que la proliferación de hepatocitos fue inducida por la infusión de HSCA (Terai et al. 2006).

El trasplante de HSCA de médula ósea CD133⁺ por vía portal ha sido utilizado para impulsar la regeneración hepática en pacientes con carcinoma hepatocelular, después de la embolización de la rama de la vena porta donde se localiza el tumor, esto con el fin de someter a hepatectomía posterior a éstos pacientes, sin deterioro en la función hepática (Furst et al. 2007, Esch et al. 2005). El crecimiento de los segmentos II/III del hígado fue mayor en los pacientes que recibieron el trasplante de células CD133⁺. La mayor ganancia en volumen hepático en los pacientes que recibieron las células autólogas CD133⁺ fue durante los primeros 21 días, la ganancia del volumen hepático fue de más del doble (Baccarini et al. 2006).

Las células hematopoyéticas circulantes contribuyen a la reparación de órganos sólidos como el hígado. Las células progenitoras del sistema hematopoyético adulto podrían potencialmente ser de uso clínico para generar hepatocitos que reemplacen tejido hepático dañado o deficiente. (Khan et al. 2008). Estudios clínicos han demostrado la seguridad y tolerabilidad de la inyección de células CD34⁺ con seguimiento a 2 y 6 meses (Gordon et al. 2006 y Korbling et al. 2002).

El seguimiento a corto y largo plazo después de trasplante autólogo único de células madre mesenquimales fue estudiado en una población mayor de pacientes (Liang et al. 2011) con insuficiencia hepática secundaria a infección por virus de hepatitis B (VHB).

La infusión de células se hizo en la arteria hepática en un volumen de 120 mL, sin complicaciones. Los 53 pacientes que recibieron el trasplante celular fueron comparados con 105 pacientes de un grupo control. El éxito del procedimiento fue del 100%. Los niveles de albúmina (ALB), bilirrubina total (BT), tiempo de protrombrina (TP) y la puntuación del modelo de enfermedad hepática terminal (MELD) tuvieron una notable mejoría después de 2-3 semanas del trasplante de células, al compararlos con el grupo control. El seguimiento fue a 192 semanas no se encontró diferencia en la incidencia de carcinoma hepatocelular o mortalidad al comparar con el grupo control (Liang et al. 2011).

En nuestro grupo existe experiencia preliminar con trasplante de HSCA en 2 pacientes como uso compasivo, uno de ellos paciente femenino que presentó hepatitis autoinmune subaguda la paciente fue puesta en lista de espera para trasplante hepático ortotópico. Se inició el estímulo con 300µg G-CSF durante 4 días, se obtuvieron las células CD34⁺ mediante aspiración de médula ósea y se prepararon a una concentración de 52.6×10^6 y fueron perfundidas en la vena porta en un volumen de 100 mL. El procedimiento fue tolerado satisfactoriamente por la paciente, tuvo una mejora gradual y se retiró de la lista de espera para trasplante 7 días después de haber recibido el trasplante de HSCA, las interleucinas IL-1, FNT- α , IL-6, así como haptoglobina, AFP estuvieron dentro de límites normales los días 3, 7, 14 y 1, 4, 5 y 6 meses siguientes al trasplante de HSCA, la paciente continuó presentando mejoría en el funcionamiento hepático. La biopsia hepática un año después al trasplante HSCA mostró solamente colestasis sin actividad y sin cirrosis, la paciente ha continuado en seguimiento y actualmente tiene 5 años de seguimiento con pruebas de funcionamiento hepático normales y recibe únicamente el tratamiento para la hepatitis autoinmune (Muñoz et al. 2011). En otro paciente fue un masculino de 27 años, que recibió trasplante hepático ortotópico 11 años antes (2001) y que 6 años después empezó a tener manifestaciones de daño hepático avanzado confirmado por biopsia hepática y por fibromax F4 (0.74), A2-A3 (0.01) respondiendo, a la aplicación del hígado artificial (MARS), se estabilizó temporalmente y 5 años después (2012) de nuevo se manifestó con insuficiencia hepática haciendo patente la necesidad de recibir un re-trasplante, como esto es algo complejo se decidió volver a someterlo a MARS y prepararlo para recibir trasplante de HSCA, recibió 4 sesiones de MARS, se

preparó con G-CSF 300 µg sc/d/x5 días alcanzando 38,000 leucocitos. El 1/08/12 recibió trasplante de HSCA CD34⁺ (24.7x10⁶/50mL) por radiología intervencionista en vena porta (transhepática), se tomó biopsia hepática revelando: cirrosis, pérdida de conductos biliares, colestasis, colangitis, sin descartarse rechazo crónico. La inmunohistoquímica para CD34⁺ fue negativa. En 6 meses post-trasplante de HSCA hubo mejoría paulatina en la función hepática, disminución de amonio, la IL-6 y la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) mostraron una mejoría con disminución en sus niveles a 60 días post-trasplante de HSCA mientras que TNF-α y factor de crecimiento de epitelio vascular (VEGF) mostraron cambios menores con trasplante de HSCA (Muñoz et al. 2013).

Nuestro grupo trató a una paciente de 21 años con insuficiencia hepática subaguda por hepatitis autoinmune se trató con movilización de células madre hematopoyéticas autólogas (Muñoz et al. 2013). La biopsia hepática (03/07/13): confirmó hepatitis autoinmune (HAI) grave con necrosis del 50%. Se realizó estimulación con G-CSF 300 µg/sc/d/5d, con un aumento de CD34⁺ de 2.29/uL, viabilidad 84.5%, a 5.78/uL, viabilidad 99.73% lo cual corresponde a un incremento. Tuvo mejoría clínica con disminución de amonio, cedió la encefalopatía, INR disminuyó, aspartato aminotransferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT) tuvieron elevación inicial y posteriormente mejoría paulatina. La movilización de HSC con G-CSF, fue segura y condicionó una mejoría significativa en las pruebas de funcionamiento hepático en esta paciente con HAI grave desencadenada por una Hepatitis A (Muñoz et al. 2013).

Aunque existe una gran variedad de estudios que valoran la posible utilidad de la terapia celular para enfermedades hepáticas no se ha definido aún el alcance que este procedimiento pueda tener. Para nuestro grupo es importante establecer un control de las variables que pudieran participar en el proceso de regeneración hepática al someterse al procedimiento de terapia celular, por lo que consideramos necesario establecer modelos experimentales con variables controladas para definir la utilidad de la terapia celular y diseño posterior de estudios en humanos.

2.5.1. Terapia celular en diversos modelos de daño hepático experimentales

En el año 1999 reportaron que parte del hígado de rata podría ser repoblado por células que parecieran originarse de la médula ósea bajo condiciones de daño hepático, en el que no había ya proliferación de hepatocitos. Ratas hembra que habían recibido trasplantes de médula ósea de ratas de diferente sexo, después de lo cual se causó daño hepático. El DNA de los machos se localizó inicialmente en la fracción celular no parenquimatosa (probablemente originadas de células madre residentes hepáticas), sin embargo 13 días después del daño hepático, también fue encontrado en la fracción de hepatocitos, lo que implicó que las células ovas hepáticas derivadas de la médula ósea se estaban diferenciando en hepatocitos. También se identificaron proteínas derivadas de la médula ósea dentro de los canalículos biliares y células ovas hepáticas. En este modelo 0.14 a 0.16% de los hepatocitos mostraron evidencia de ser originarios de la médula ósea. Este trabajo fue uno de los pioneros y representó el inicio de una nueva perspectiva para la Hepatología básica y clínica moderna. Se demostró que las células progenitoras podían originarse fuera del órgano en el cual contribuyen a su reparación (Petersen et al. 1999). También se ha demostrado la plasticidad de las células hematopoyéticas progenitoras para diferenciarse en hepatocitos (Lagasse et al. 2000).

Existen menos datos en la insuficiencia hepática aguda experimental, aunque existe menor posibilidad del injerto celular después del trasplante singénico de HSCA, se ha demostrado mejoría en la sobrevida (70-75%) vs 35% en el grupo sin infusión, sin embargo, no hubo diferencia en sobrevida cuando el trasplante fue de hepatocitos vs el grupo control (Sato et al. 2005, Sakaida et al. 2004) en 2 días hubo recuperación de la histología hepática, mientras que en el grupo control todavía persistía daño histológico para el día 28. El daño se estableció con D-galactosamina, posteriormente las ratas recibieron una infusión de medio condicionado de concentrado de células madre, lo que resultó en mejor sobrevida y mejoría de parámetros bioquímicos de daño hepático. La concentración de citocinas proinflamatorias disminuyó y hubo menos infiltración de leucocitos en hígado, con disminución de la apoptosis en el 90%, y la replicación también aumentó. Este hecho puede explicar la importante velocidad a la que la reparación del daño ocurre (Sato et al. 2005, Sakadia et al 2004 y Van Poll et al. 2008).

El SDF-1 es una quimiocina CXC importante en el tráfico de células madre fetales y en particular en la anidación de estas (Molyneaux et al. 2003), siendo su receptor CXCR4,

SDF-1 también es importante en el tráfico de células madre adultas. El bloqueo de CXCR4 resulta en salida de HSCA de la médula ósea (Molineaux et al. 2003), hay menor expresión de CXCR4 en HSCA periféricas y esto confirma la función de SDF-1 de mantenerlas en su nicho de la médula ósea (Aiuti et al. 1997). Las células CD34⁺ migran hacia SDF-1 tanto *in vivo* como *in vitro* con un efecto de gradiente, por lo tanto una elevación de SDF-1 en plasma causará movilización de HSCA desde la médula ósea hacia la circulación periférica (Hattori et al. 2001). SDF-1 puede también estar involucrado en la anidación de células hacia el hígado. Se ha demostrado aumento de la expresión hepática de SDF-1 en daño hepático incluyendo hepatitis C (Kollet et al. 2003, Shimoda et al. 1998, Tereda et al. 2003), cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune y toxicidad por paracetamol (Tereda et al. 2003) y hepatitis alcohólica. SDF-1 es necesaria para la acumulación de células ovas (Gilchrist et al. 2005).

Un estudio de daño hepático inducido por CCl₄ en ratón en el cual movilizaron las HSC mediante plerixafor y G-CSF resulta un incremento en la movilización sinérgica de un alto número de células madre CD34⁺ vía antagonismo de la interacción CXCR4-SDF-1 (Dar et al. 2006) reportaron que la supervivencia sin movilización al día 7 fue del 25% y para el grupo tratado 87% (Mark et al. 2010).

En otro modelo de daño por CCl₄ en rata a las cuales se les dio infusión de MSC después de 24 horas reportó después de 7 días una disminución significativa de las transaminasas en el grupo tratado con MSC así como un daño hepático menor en el estudio histopatológico (Gruttadauria et al. 2013).

Un estudio utilizando MSC de médula ósea humana las cuales se marcaron con proteína verde fluorescente e infundieron vía porta en rata con daño hepático con hepatocitos con fibrosis casuada por CCl₄, observaron que después de un día del trasplante las células marcadas se encontraron alrededor de los lóbulos, vasos sanguíneos hepáticos. En los parámetros bioquímicos e histológicos analizados encontraron un incremento en la recuperación del hígado en el grupo tratado con trasplante de MSC, y la fibrosis disminuyó significativamente, este estudio sugiere que el trasplante de MSC puede facilitar la recuperación de un daño crónico causado al hígado y también disminuye la fibrosis, lo cual sería una opción potencial para el tratamiento de la cirrosis hepática (Chang et al. 2009).

En otro estudio compararon la influencia del trasplante de MSC obtenidas de médula ósea, por diferentes vías, la intrahepática, intraperitoneal e intravenosa en ratas con daño hepático inducido por CCl₄, las MSC las diferenciaron a hepatocitos las marcaron y las trasplantaron, las células se encontraron alrededor de los lóbulos hepáticos por los tres tipos diferentes de vías pero en proporción más alta las que recibieron el trasplante por vía intravenosa, ésta resultó ser más efectiva en el desempeño de recuperación del hígado además se observó mayor producción de IL-10 comparando con las otras modalidades de trasplante (Zhao et al. 2012).

En otro grupo de investigación evaluaron el efecto terapéutico del trasplante de las MSC obtenidas de tejido adiposo en ratones con daño hepático causado por CCl₄. Las MSC de tejido adiposo mejoraron la función hepática, se observaron cambios en los niveles de amonio, ácido úrico, AST, ALT regresando a niveles casi normales después del trasplante de MSC de tejido adiposo. Ellos también realizaron un ensayo *in vitro* para conocer el mecanismo que envuelve la habilidad terapéutica comparando la producción de citocinas como IL-6, IL-8, G-CSF, HGF, entre otros en cultivo de MSC obtenidas de AT, médula ósea y en fibroblastos dérmicos humanos y observaron que en las MSC obtenidas de tejido adiposo hubo una alta producción en comparación con los otros dos tipos de células, lo cual sugiere que este tipo de células puede ofrecer una mayor eficacia como terapia celular, en este caso mencionamos en los modelos experimentales con daño hepático, enfermedades hepáticas y así poder dar un tratamiento (Banas et al. 2008).

Otro grupo de investigadores en el año 2013 investigaron si una infusión de MSC-CXCR4 podrían proteger a los hepatocitos y estimular la regeneración en el trasplante reducido en un 50% del hígado. Se compararon las MSC marcadas con proteína verde fluorescente (GFP) y las MSC-CXCR4. Los factores secretados por las MSC, la función del injerto, la apoptosis, proliferación de los hepatocitos, la ALB y la citoqueratina 18 (CK18) fueron evaluados. La infusión vía intravenosa mediante la vena del pene de MSC-GFP condujo a una reducción de los biomarcadores de lesión hepática. Sin embargo, la sobreexpresión de CXCR4 mejoró la proliferación de hepatocitos y los niveles de IL-6, factor de crecimiento endotelial vacular (VEGF). El SDF-1 alfa fue elevado después de trasplantados reclutando mejor las MSC-CXCR4. Las MSC implantadas no expresaron los marcadores de los hepatocitos, incluyendo la ALB y CK18

in vivo 168 horas después del trasplante. En este estudio es de notar que la sobreexpresión de CXCR4 realizó la movilización y la repoblación de MSC en injertos de hígado de tamaño pequeño, en los cuales estas células promovieron la regeneración del hígado temprana no mediante una diferenciación directa, quizás por un mecanismo parácrino (Du et al. 2013).

Este proyecto representa el inicio de una serie de trabajos para la implementación del trasplante de células madre como tratamiento del daño hepático avanzado, abarcando el enfoque en el trasplante de MSC y/o la movilización de HSC para la aplicación y mayor efectividad de esta modalidad terapéutica en un modelo experimental de cirrosis hepática inducida por CCl₄.

CAPÍTULO III

JUSTIFICACIÓN

La cirrosis hepática ocupa la 4ª causa de muerte en México, su tratamiento actual es el trasplante hepático, sin embargo la mayoría de los pacientes no tienen acceso a éste por la limitante económica y escasez de donadores, que hacen que algunos de éstos fallezcan en lista de espera. Una opción potencial para estos pacientes puede ser la terapia celular al ser más accesible y menos costosa. Esta pudiera retrasar o evitar la necesidad de un trasplante hepático.

En este trabajo se pretende evaluar la efectividad con dos tipos de terapia mediante la administración vía intravenosa de células madre mesenquimales y la movilización de células madre hematopoyéticas con ello se analizará el efecto reparador de dicha terapia en la cirrosis hepática mediante: citocinas y mejora de la histología hepática en un modelo experimental que permita a futuro extrapolar los hallazgos a un estudio fase pre clínica en humanos.

La terapia celular tendría un gran impacto social reduciendo la necesidad de trasplante hepático, mejorando la calidad de vida y salud del paciente.

CAPÍTULO IV

HIPÓTESIS

El trasplante de MSC obtenidas de tejido adiposo y la movilización de HSC disminuyen la fibrosis en el hígado dañado en el modelo experimental con daño hepático por CCl₄.

CAPÍTULO V

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Inducir la movilización de células madre hematopoyéticas endógenas (HSC) con factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y / o administración intravenosa de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (MSC) para disminuir la fibrosis hepática en una modelo experimental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Reproducir un modelo de daño hepático inducido por CCl₄ en ratas Wistar.
2. Estandarizar las técnicas de aislamiento de tejido adiposo, caracterización y cultivo para el trasplante de células madre mesenquimales en el modelo con daño hepático inducido por CCl₄
3. Analizar expresión del receptor CXCR4 en las células madre mesenquimales de tejido adiposo.

4. Desarrollar el modelo de movilización de HSC mediante la administración del G-CSF y trasplante de MSC en ratas con daño hepático inducido con CCl₄.
5. Evaluar las enzimas hepáticas e histología en el modelo con daño hepático inducido con CCl₄ tratado con trasplante de MSC y movilización de HSC.
6. Determinar los cambios séricos de interleucinas: IL1, IL6, TNF α , IL10, factores de crecimiento: HGF y TGF β basal, post- daño inducido, post-tratamiento con seguimiento dependiente a la etapa seleccionada en el modelo con daño hepático inducido con CCl₄.
7. Evaluar la actividad proliferativa y expresión de SDF-1 en el modelo con daño hepático inducido con CCl₄ tratado con trasplante de MSC y movilización de HSC.
8. Evaluar el reclutamiento de las MSC en dos etapas: la primera 3 días post-trasplante de MSC marcadas con GFP, y la segunda con rastreo del cromosoma Y mediante FISH a largo plazo en el modelo con daño hepático inducido con CCl₄.

CAPÍTULO VI

ESTRATEGIA GENERAL

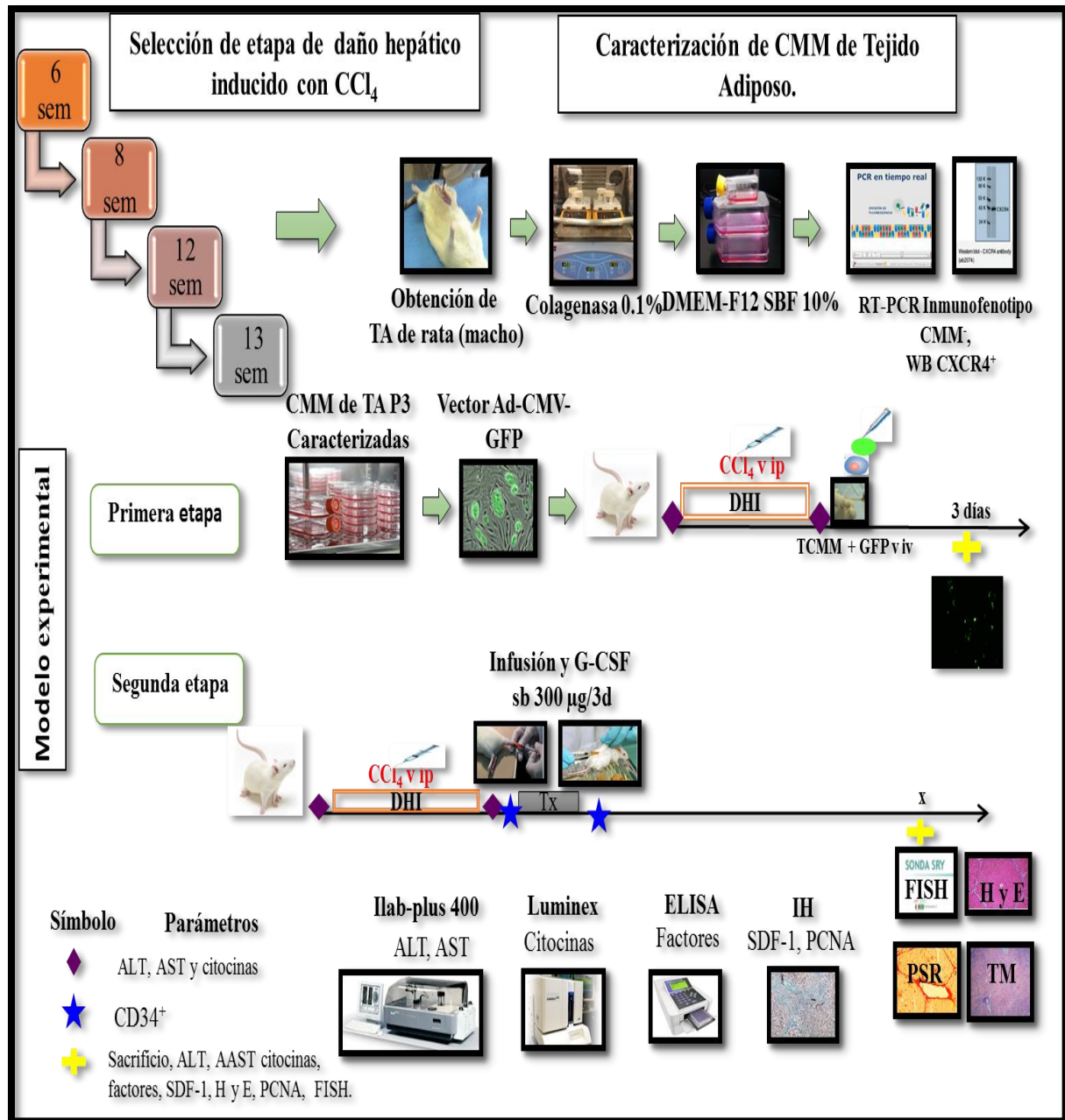


Figura 2. Estrategia experimental.

Para llevar a cabo la estrategia general se llevó a cabo lo siguiente:

Selección de la etapa con daño hepático inducido con CCl₄. Para llevar a cabo el desarrollo del modelo experimental primeramente se tuvo que seleccionar la etapa de daño hepático inducido con CCl₄ que semejara la etapa de cirrosis.

Obtención, aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de tejido adiposo de rata Wistar macho. A partir del tejido adiposo extraído, se aislaron las MSC por método enzimático, cultivando el infranadante obtenido en el proceso. Las MSC se cultivaron con DMEM, 10% FBS, 1% L-Glutamina y 1% Antibiótico. Para la inmunotipificación se analizaron marcadores de superficie mesenquimales y hematopoyéticos para las MSC en tercer pasaje por RT-PCR.

Desarrollo del modelo experimental. Una vez establecida la etapa de cirrosis se llevó a cabo el tratamiento con la terapia celular para darle un seguimiento a las MSC.

- **Primera etapa.** En esta etapa se pretendió dar seguimiento a las MSC marcadas con un vector ADV-CMV-GFP administradas vía intravenosa a corto plazo 3 días post-trasplante.
- **Segunda etapa.** Se determinó si las MSC realmente se quedaron en el parénquima hepático dañado mediante la técnica de Hibridación in situ fluorescente (FISH).

En éstas dos etapas se llevaron a cabo en diferentes tiempos determinaciones de citocinas, enzimas hepáticas, así como tinciones histológicas de hematoxilina y eosina (H y E), tinción tricrómico de Masson (TM) y Rojo de Sirius (RS).

CAPÍTULO VII

METODOLOGÍA

7.1. Modelo experimental

Para el modelo de daño hepático se emplearon ratas hembras de la cepa Wistar, con un peso corporal inicial aproximado de 200 gramos con acceso libre al agua, alimento y con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Se estableció el modelo experimental de daño hepático avanzado mediante la intoxicación con CCl₄ (el CCl₄ está disponible en Sigma-Aldrich solicitando que es para uso experimental) durante diferentes tiempos y dosis administradas.

7.1.1. Experimento 1. Preeliminar

Se administró una de dosis de 1mL/kg de CCl₄ al 10% en aceite mineral administrados vía intraperitoneal 3 veces por semana (Lee et al. 2005) durante 6, 10 y 12 semanas. Únicamente se incluyeron 3 ratas hembras.

7.1.2. Experimento 2. Aumento de Dosis de CCl₄

Se inició con la dosis de 1mL/kg de CCl₄ al 10% en aceite mineral administrados vía intraperitoneal 3 veces por semana, a la semana 6 se realizó un cambio en la dosis aumentado iniciando con un incremento 500 mg de CCl₄ y aumentado gradualmente cada semana 570 mg, 610 mg, 850 mg, 1000 mg respectivamente en aceite mineral en una volumen total de 250 µL. Este experimento consistió en 3 grupos uno de machos y dos de hembras los cuales se sacrificaron a la semana 11, 12 y 13.

7.1.3. Experimento 3. Dosis de CCl₄ más Pentobarbital 0.3g/L en la bebida.

En la primera semana se les administró 2 veces la dosis de 1mL/kg de CCl₄ al 10% en aceite mineral vía intraperitoneal 3 veces por semana, a partir de la segunda semana se empezó con el esquema de dosis de 500 mg, 570 mg, 610 mg, 850 mg, 1000 mg por kilogramo de peso ésta última durante 2 semanas aunado al esquema de dosis iniciando en los 500 mg de CCl₄ se agregó Pentobarbital 0.3/L en la bebida diaria. En este experimento se incluyeron 7 ratas hembras. El tiempo total fue de 7 semanas.

7.1.4. Experimento 4. Modelo de daño hepático inducido con CCl₄ durante 8 semanas con un esquema de dosis aumentado por semana.

Se llevó a cabo con el siguiente esquema: 500 mg, 570 mg, 610 mg, 850 mg, 1000 mg por kilogramo de peso ésta última manteniéndose durante 4 semanas. Las dosis fueron administradas con una frecuencia de 3 veces por semana en 250 μ L de aceite mineral vía intraperitoneal. Se incluyeron únicamente hembras y se sacrificaron a la semana 8.

7.2. Obtención de tejido adiposo de rata y aislamiento de células madre mesenquimales

El tejido adiposo se obtuvo de ratas Wistar macho bajo anestesia con pentobarbital sódico 60 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal con previa asepsia de la zona, se realizó un corte longitudinal de la piel de aproximadamente 5 cm sobre el abdomen hasta antes del aparato reproductor. Se obtuvo AT abdominal subyacente a la piel y posteriormente se abordó la cavidad abdominal mediante un corte limpio de musculo para exponer órganos abdominales y el tejido adiposo abdominal. La recolección se realizó en un tubo Falcón de 50 mL con 10 mL de PBS estéril y una mezcla de antibióticos-antimicóticos al 1X, hasta que se obtuvo aproximadamente 3 gr de tejido por tubo de recolección (Dubois et al. 2008). Al finalizar se sacrificó a la rata de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 la cual nos especifica técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

El AT se colocó en una caja petri estéril con PBS, antibiótico- antimicótico 1X. Con ayuda de una hoja de bisturí, se cortó finamente hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla se colocó en un frasco estéril con una solución de collagenasa I 0.1%, a un volumen que cubrió perfectamente todo el tejido adiposo. Se incubó a 37°C con agitación durante 1 hora o hasta que se observó una suspensión turbia y homogénea. Se dejó reposar la digestión hasta observar dos fases. Se recuperó el infranadante y se transfirió a un tubo falcón de 15 mL estéril y agregó un volumen igual de PBS 1X estéril. Se centrifugó a 1500 rpm durante 6 minutos. Se eliminó el sobrenadante y la grasa que quedó en la superficie. Se lavó el botón celular con PBS 1X estéril y se centrifugó a 1500 rpm durante 6 minutos. Se repitió el lavado con PBS 1X estéril hasta eliminar restos celulares y grasa contaminante. El botón de células del último lavado se resuspendió en 1 mL de medio DMEM FBS 10% antibiótico-antimicótico se sembró en una 1 botella T25 con medio DMEM Advanced al 10% de FBS y la mezcla de antibiótico-antimicótico 1X.

Se cultivó a 37°C, 5% de CO₂, y 95% de humedad. Después de 3 días se observó si las células se adhieren al plato de cultivo y se realizó un lavado con PBS y cambio de medio de cultivo fresco. Una vez que alcanzaron una 80% de confluencia, las células fueron resemebradas en 2 botellas limpias T75 al cabo de 1 semana al llegar nuevamente a la confluencia de 80% se realizó nuevamente una resiembra con tripsina al 0.25% y así sucesivamente hasta que se llegó al pasaje 3.

En la Figura 5 se muestra un esquema del procedimiento empleado para la obtención del AT y aislamiento de las MSC.

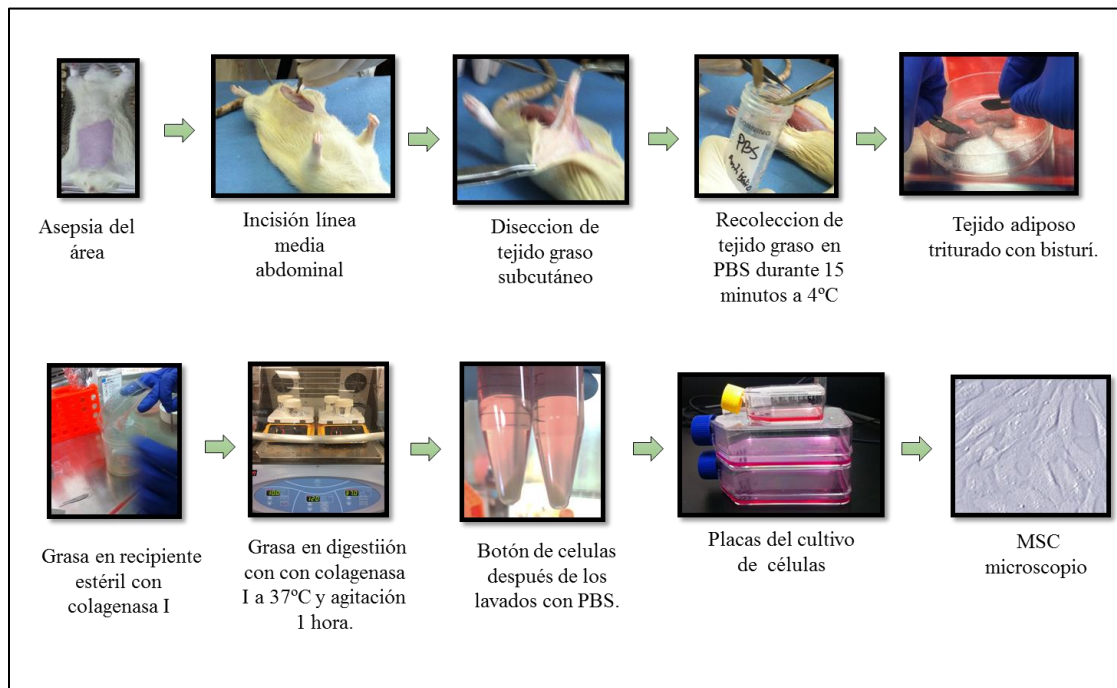


Figura 3. Aislamiento y obtención de MSC obtenidas de tejido graso.

7.2.1. Caracterización de las MSC derivadas de tejido graso.

Se utilizó un promedio de 6×10^6 células por rata en tercer pasaje cultivadas con medio para MSC, las cuales se despegaron de la placa con tripsina 0.025% por 5 min a 37°C, posteriormente se inactivó la tripsina colocando el mismo volumen de medio con FBS 10%. Se obtuvo la pastilla por centrifugación a 1600 rpm por 6 min, se decantó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con buffer de tinción y posteriormente se centrifugaron a 300g por 5 minutos. Una vez lavadas las células se realizó la caracterización.

La caracterización de las MSC se realizó mediante PCR tiempo real con iQ Sybr-Green 2X Master Mix (Bio Rad, USA) para el análisis de la expresión de los marcadores CD105 (5'-TGG TCT TTT CGA ACG AGA ATG-3'/ 5'-AGC CGG AGG ACA ATG CTT TTG G-3'), CD90 (5'-TTT ATC AAG GTC CTT ACT CTA GCC-3'/ 5'- CAG TCA CAG AGA AAT GAA GTC C-3'), CD45 (5'TCC ACG GGT ATT CAG CAA GTT TC – 3'/ 5'- CCA GAT CAT CTT CCA GAA GTC ATC – 3') y CD34 (5'-AAG ATC TTG GGA GCC ACC AGA G-3'/ 5'-TAG CCC TGG CCT CCA CCA TTC-3'), empleando B-actina (5'-GTC ACC TGG GAC GAT ATG G-3'/5'-AAG TCT AGG GCA ACA TAG CAC AG-3') como gen de referencia.

7.2.2. Análisis de la expresión del receptor CXCR4

Para analizar la expresión del receptor CXCR4 en las FBS se llevó a cabo mediante la técnica de Wester blot para el cual se siguió el siguiente protocolo:

Las muestras se mantuvieron a -20°C, en buffer para extracción de proteínas (RIPA). Para preparar la curva de calibración se utilizó BSA como stock de proteínas en una concentración de 1 mg de BSA/ mL H₂O miliQ. Posteriormente en una placa de 96 pozos se colocaron los volúmenes indicados en la Tabla 1.

Tabla 1. Curva estándar para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Pozo	Concentración de proteína (µg/mL)	H ₂ O (µL)	BSA 0.5 mg/mL (µL)	Bradford diluido 1:5 (µL)
1	0	40	0	180
2	0.5	39	1	180
3	1	38	2	180
4	1.5	37	3	180
5	2	36	4	180
6	2.5	35	5	180
7	3	34	6	180
muestra	directa	39	1	180

Una vez que se agregó el Bradford se llevó la placa a agitación durante 2 minutos. Seguido a esto se cuantificó la cantidad de proteína en el equipo iMARK/Bio-RAD. Posteriormente se realizó una gráfica en excel y se determinó la línea de tendencia y utilizó la ecuación para calcular la concentración de las muestras.

Se realizó una electroforesis en gel para determinación de integridad de proteínas para la cual se utilizó un gel comercial el cual sacamos de su empaque y se retiró el peine con cuidado de no mover los pozos. Posteriormente se ensambló el gel en la cámara interna de electroforesis, procurando que el lado en el que se ponen las muestras quede hacia adentro de la cámara interna, una vez que se instaló la cámara en la caja de electroforesis se agregó el buffer de corrida frío en la cámara interna, llenando hasta que el buffer pase el nivel de los pozos; y se vigiló que la cámara no presentara alguna fuga. Después se agregó el buffer de corrida frío en la parte exterior de la cámara interna. Las muestras se prepararon en una relación 1:1 con el buffer de carga 2X y se calentaron a 95°C por 5 min. Se cargaron con una puntilla delgada para evitar que se derramaran hacia los pozos vecinos. Las condiciones de corrida fueron de 125 V durante 2 horas.

El gel resultante se sometió al protocolo de Wester Blot para el cual se realizó lo siguiente.

Acondicionamiento de la membrana se recortó un pedazo de membrana PVDF aproximadamente de 6x8 cm. Posteriormente se sumergió la membrana en Metanol 100% durante 15 segundos y se transfirió la membrana a un contenedor de agua miliQ por 2 minutos asegurándonos de que no queden puntos secos sobre la membrana y se equilibró la membrana en el buffer de transferencia por lo menos durante 5 minutos.

Seguido a lo anterior se remojaron las esponjas, papel filtro y la membrana (equilibrada) en buffer de transferencia frío. Se retiró y descartó a partir del gel de poliacrilamida la porción correspondiente al gel concentrador y se colocaron los componentes del sándwich de transferencia: de la siguiente manera:

- Tapa negra en el lado inferior
- Esponja
- Gel
- Membrana
- Papel filtro
- Esponja
- Tapa transparente

Una vez que se aseguró que no existen burbujas entre el gel y la membrana se colocó el sándwich en el tanque de transferencia.

Se transfirió a 4°C durante 1 hora a 100 volts y posteriormente se reveló la transferencia con la solución de azul de comassie durante 5 minutos y se lavó la membrana con buffer de solución salina Tris-Tween (TBST) hasta eliminar por completo el colorante rojo.

Se reactivó la membrana con metanol y lavó con TBST antes de incubar con la solución de bloqueo.

Posteriormente se realizó la incubación durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario CXCR4 utilizando como solución de bloqueo 1% de leche. Después de incubar toda la noche se procedió a realizar una serie de lavados. Se colocó la membrana con TBS-T 1x (frio), se agitó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el líquido y agregó nuevo TBS-T 1x, y se agitó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se repitió lo mismo dejando 15 minutos en agitación. Una vez realizados los lavados se utilizó un anticuerpo secundario de conejo así se detectó la región HRP del anticuerpo primario. Se preparó la dilución 1:20000 para el anticuerpo secundario con TBS-T 1x. Se colocó la membrana y el anticuerpo secundario en un tubo falcón y se dejó en agitación por 1 hora a temperatura ambiente. Una vez terminada la incubación se repitió la misma serie de lavados con TBST-1x durante 5, 10 y 15 minutos respectivamente. Para el revelado se utilizó el equipo ChemiDoc/ BIO-RAD para captar la reacción luminosa resultante de la adición del revelador luminol (Clarity Western ECL Substrate).

7.3. Grupos de trabajo

Grupos para evaluación del reclutamiento de MSC a corto plazo

Grupo CCl₄ + MSC-GFP: 3 ratas con daño hepático inducido con CCl₄, con una aplicación de 3×10^6 MSC marcadas por transducción con un vector adenoviral que expresa la proteína verde fluorescente (GFP).

Grupo Control + MSC-GFP: 3 ratas sin daño hepático (aplicación de vehículo y con una aplicación de 3×10^6 MSC marcadas por transducción de un vector adenoviral que expresa la GFP).

Grupo Control: 3 ratas las cuales recibirán 250 µL de vehículo vía intraperitoneal a una dosis igual al volumen de CCl₄ posteriormente se les administró vía intravenosa solución salina fisiológica simulando el trasplante de MSC.

Grupos para evaluación del reclutamiento de MSC a largo plazo

Grupo CCl₄: 3 ratas con daño hepático crónico inducido con CCl₄ administrado vía intraperitoneal, sin tratamiento se sacrificaron a los 2 meses post-trasplante.

Grupo CCl₄ + MSC: 3 ratas con daño hepático crónico inducido con CCl₄ administrado vía intraperitoneal, tratadas con 3×10^6 MSC administrándolas vía intravenosa se sacrificaron a los 2 meses post-trasplante.

Grupo CCl₄ + G-CSF: 3 ratas con daño hepático inducido con CCl₄, con administración vía subcutánea del G-CSF a una dosis de 300 µg/kg durante 3 días posteriormente se sacrificaron a los 2 meses post-trasplante.

Grupo CCl₄ + G-CSF + MSC: 3 ratas con daño hepático inducido con CCl₄, tratadas con 3×10^6 células madre mesenquimales vía intravenosa y administración subsecuente vía subcutánea del G-CSF a una dosis de 300 µg/kg durante 3 días se sacrificaron a los 2 meses post-trasplante.

Grupo Control: 3 ratas las cuales recibieron 250 µL de vehículo vía intraperitoneal a una dosis igual al volumen de CCl₄ posteriormente se les administró vía intravenosa solución salina fisiológica simulando el trasplante de MSC y se sacrificaron a los 2 meses post-trasplante.

En la Figura 6 se muestran los diferentes grupos de trabajo.

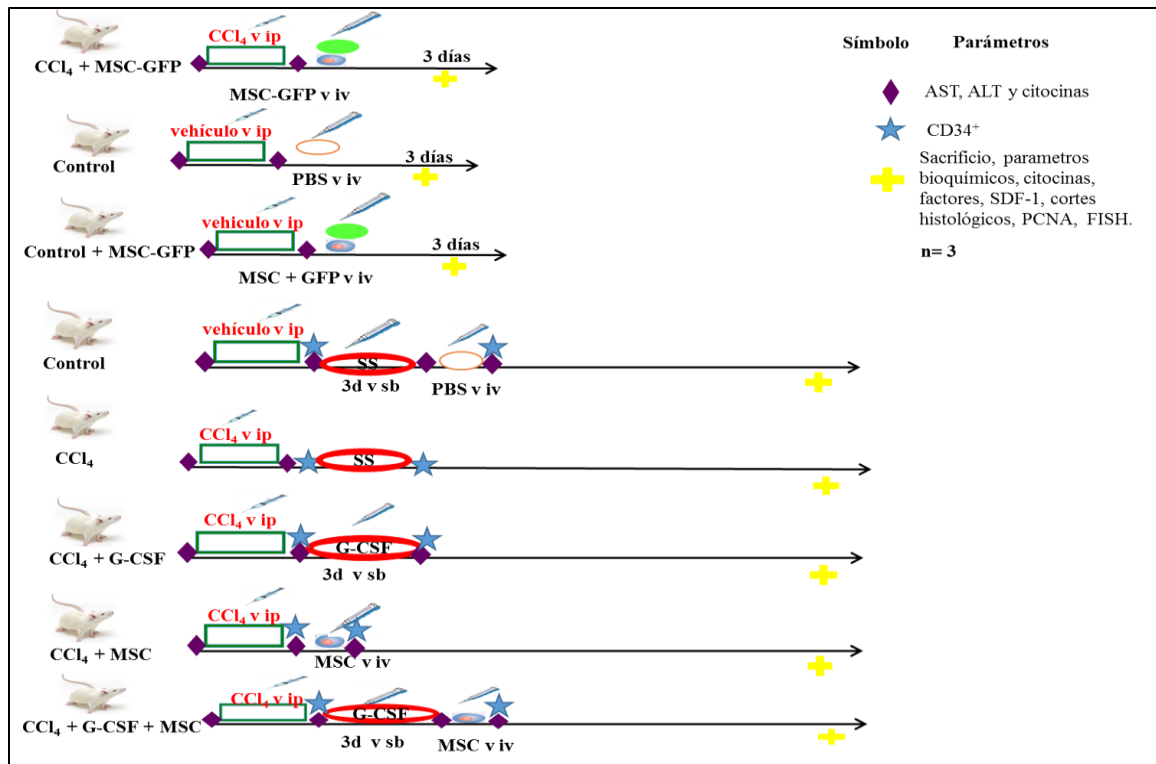


Figura 4. Grupos experimentales.

7.4. Determinación de enzimas hepáticas

Se realizaron mediciones cada 2 semanas de AST y ALT durante la estandarización del modelo experimental. Una vez establecido el modelo experimental únicamente se realizaron las mediciones de ALT y AST pre, post daño inducido y al finalizar el seguimiento.

La sangre se obtuvo de la cola de las ratas y al finalizar por punción cardiaca y las muestras fueron analizadas mediante el Ilab 300 Plus con 300 μ L.

7.5. Determinación de citocinas

Se determinaron los niveles séricos de las interleucinas: IL1- β , IL6, IL-10 y TNF- α pre y post inducción de daño hepático y al finalizar el seguimiento a través Luminex.

Para la preparación de la muestra fue necesario realizar una dilución 1:2 con buffer de ensayo. Posteriormente se llevaron las muestras al vortex.

Todos los reactivos que se emplearon durante el ensayo se dejaron atemperar para su uso. Primeramente se añadieron al plato 200 μ L de buffer de ensayo por pozillo y se agitaron por 10 minutos, posteriormente se decantaron por inmersión del plato. A su vez se añadió

25 µL de estándar ó control en el pozillo correspondiente, 25 µL buffer de ensayo a los pozillos blancos, y 25 µL a los pozillos correspondientes a las muestras. Se añadió también 25 µL de solución de matriz a los pozillos blancos, estándares y controles. En los pozillos correspondientes a las muestras se añadió 25 µL de la muestra diluida previamente con 1:2 con buffer de ensayo. A cada pozillo se le añadió 25 µL de perlas. Así se llevaron a incubar durante 2 horas. Se removió todo el contenido del plato por inmersión y se realizaron 2 lavados con 200 µL de buffer de lavado. Posteriormente se añadieron 25 µL de anticuerpos de detección por pozillo. Se realizó una segunda incubación por 1 hora. Después de la incubación se añadieron 25 µL de Streptavidina – Pycoerytrina por pozillo y se realizó una incubación durante 30 minutos. Se removió el contenido del plato y se realizaron 2 lavados con buffer de lavado. Se añadieron 125 µL de buffer para lectura, se dejó en reposo durante 5 minutos y se llevaron al Luminex para la lectura.

7.6. Determinación de factores de crecimiento HGF y TGF- β

Se determinaron los niveles séricos de HGF y TGF- β pre y post inducción de daño hepático y al finalizar el seguimiento mediante ELISA.

En el caso de la determinación de HGF (MHG00, R&D Systems) previamente los reactivos que se emplearon durante el ensayo se dejaron atemperar para su uso.

Primeramente se prepararon todos los reactivos incluidos estándares (se reconstituyó una solución stock de 4000 pg/mL posteriormente se realizaron diluciones seriadas para obtener 2000, 1000, 500, 250, 125 y 62.5 pg/mL respectivamente), los controles (únicamente se reconstituyeron con 1 mL de agua desionizada) y para las muestras fue necesario realizar una dilución 1:10: 20 µL muestra + 180 µL de diluyente calibrador RD5-26 previamente diluido 1:4. Posteriormente se llevaron las muestras al vortex. Una vez preparados los reactivos se añadió a cada pozillo de trabajo 50 µL de diluyente de ensayo RD1-38. A su vez se añadió de acuerdo a lo correspondiente 50 µL de estándar, control o muestra en cada pozillo. Se cubrió con material adhesivo y se dejó en incubación durante 2 horas. Transcurrido el tiempo se aspiró cada tubo y se realizaron 5 lavados a cada uno con el buffer de lavado cada uno con 400 µL por pozillo, en cada uno se secó por inversión en toallas secantes. Realizados los lavados se procedió a añadir 100

μL del conjugado Ratón/Rata HGF a cada pozillo, se cubrió la placa con material adhesivo y se incubó nuevamente 2 horas a temperatura ambiente. Al cumplirse el tiempo se procedió nuevamente a realizar los 5 lavados con 400 μL en cada lavado de buffer de lavado por pozillo. Al cumplirse el tiempo se añadió 100 μL de solución de substrato a cada pozillo y se incubó durante 30 minutos protegiéndolo de la luz. Posteriormente se añadió 100 μL de solución de parada a cada pozillo. Se mezcló sutilmente y se procedió a determinar la densidad óptica en un transcurso no mayor a 30 minutos en el espectrofotómetro a 450 nm.

Por otro lado en el caso del TGF- β (ab119558, abcam) previamente los reactivos que se emplearon durante el ensayo se dejaron atemperar para su uso.

Se realizó un pretratamiento a la muestra de suero de rata antes de iniciar el procedimiento: 920 μL buffer de ensayo + 20 μL muestra + 30 μL HCl 1N y se dejó incubando por 1 hora y posteriormente se añadió 30 μL NaOH 1N.

Para iniciar el procedimiento se realizaron 2 lavados con solución de buffer de lavado 1X 400 μL por pozillo. Después de realizar los lavados y realizar el secado con las toallitas absorbentes por inversión de la placa, se dejó secar un lapso no mayor a 15 minutos. Posteriormente se añadió 100μL de estándares previamente preparados (4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.3 pg/mL) en cada pozillo correspondiente. En los pozillos a los cuales se añadió muestra se colocó 80 μL de buffer de ensayo 1X y 20 μL de muestra pretratada en cada pozillo. Posteriormente se cubrió la placa con material adhesivo durante 2 horas en agitación a 400 rpm. Al finalizar el tiempo se removió el material adhesivo y se realizaron 5 lavados en cada pozo con 400 μL de buffer de lavado 1X y se secó la placa con toallitas absorbentes por inversión. Posteriormente se añadió 100 μL del anticuerpo conjugado con biotina a cada pozillo. Se cubrió con material adhesivo y se dejó incubando durante 1 hora a una temperatura de 18 – 25 °C e agitación a 400 rpm. Transcurrido el tiempo se realizaron 5 lavados con 400 μL de buffer de lavado 1X cada pozillo se deshecho y secó con toallitas absorbentes por inversión de la placa. Finalizado esto se añadió 100 μL de solución de substrato TMB a cada pozillo. Se incubó a una temperatura de 18 – 25 °C durante 30 minutos evitando la exposición a la luz. Posteriormente se añadió 100 μL de solución de parada y se procedió a leer absorbancia en un espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 450 nm.

7.7. Exámenes histopatológicos

Después del sacrificio de los animales en estudio de cada grupo, una parte del tejido hepático se fijó en formol al 10% y se procesó para incluirlo en parafina. De las secciones se realizaron cortes de 5 μ m de espesor y se realizaron las tinciones de H y E, TM y RS para colágena.

7.7.1. Inclusión en parafina

Las muestras colocadas en cassetes y embebidas en formol al 10% se deshidrataron en acetonas graduales 70%, 90%, 90%, 100%, 100%, 20 min en cada una. Después se colocaron en las siguientes soluciones acetona/xilol, xilol 100%, xilol 100% cada una por 20 min. Posteriormente se colocaron en dos soluciones de parafina líquida por 30 min en cada una a 60°C. Después se colocaron las muestras en bloques de inclusión y se embebieron las muestras con parafina, se dejó enfriar el bloque para después desmontarlo del bloque y proceder a hacer los cortes en micrótopo. Para poder realizar las tinciones las laminillas con los cortes se colocaron en un horno a 60°C por 15 min para desparafinizar, posteriormente se colocaron en xilol 5 min, etanol/xilol 5 min, etanol absoluto 2 min, alcohol de 96° por 2 min y se enjuagaron lentamente en agua destilada. En estas condiciones se procedió a realizar las tinciones correspondientes.

7.7.2. Tinción de Hematoxilina y Eosina

Una vez desparafinado se colocaron en solución de hematoxilina por 2 min y se realizaron dos lavados con agua de la llave lentamente. Después se realizó una inmersión rápida en alcohol ácido. Se realizaron dos lavados con agua de la llave lentamente, posteriormente con agua destilada. Después se realizaron dos inmersiones rápidas en agua amoniacal y un enjuague lento con agua de la llave y agua destilada. Inmediatamente después se realizaron 6 inmersiones rápidas en eosina. Se deshidrataron en alcoholes 96%, etanol absoluto, alcohol-xilol por 15 s cada uno y se aclararon en 2 cambios de xilol de 15 s cada uno y se montaron con resina.

Las laminillas se observaron bajo microscopio óptico (Olympus BH-2) y se les tomó fotografía.

7.7.3. Tinción tricrómico de Masson

Una vez desparafinado se colocaron en solución de Bouin durante toda la noche a temperatura ambiente o de 30 a 60 min a 65°C. Posteriormente se lavaron con agua de la llave hasta que se pierda el color amarillo y enjuagar con agua destilada. Para teñir núcleos se dejaron en hematoxilina férrica de Weigert por 10 min. Posteriormente se lavaron con agua de la llave por 5 min. y se enjuagó con agua destilada hasta que dejó de salir el color de la hematoxilina. Después se tiñió en solución de fucsina-escarlata por 5 s (el tiempo depende de la muestra). Se realizaron lavados en agua destilada hasta dejar de teñirse. Se colocaron en solución de ácidos fosfotúngstico-fosfomolibdico por 10 min. Posteriormente se enjuagaron brevemente en agua destilada. Se tiñio con azul de anilina por 15 s (el tiempo depende de la muestra). Posteriormente se realizó un lavado con agua destilada hasta que dejó de teñirse. Se realizó una inmersión de 15 s en ácido acético acuso al 1%. Después se deshidrató en alcoholes 96%, etanol absoluto, alcohol-xilol por 15 s cada uno y se aclararon en 2 cambios de xilol de 15 s cada uno y montaron con resina.

Las laminillas se observaron bajo microscopio óptico (Olympus BH-2) y se les tomó fotografía.

7.7.4. Tinción Rojo sirius

Primeramente se desparafinizaron las secciones necesarias e hidrataron en agua destilada. Se aplicó adecuadamente la solución de RS cubriendo completamente las secciones de tejido e incubaron durante 60 min. Se enjuagaron rápidamente los cortes en 2 cambios de solución de ácido acético. Posteriormente se enjuagaron los cortes en alcohol absoluto y se deshidrataron en 2 cambios de alcohol absoluto. Por último se limpió el corte y se montó con resina sintética.

7.7.5. Inmunohistoquímicas

Las muestras incluidas en parafina se desparafinizaron y se hidrataron con agua destilada por 20 s. Posteriormente se reactivó la antigenicidad del tejido con buffer de citratos pH 6 a 80-90°C por 20 min. Después se lavaron con PBS-Tritón (3 gotas en 500 mL de PBS)

dos veces por 5 min. Se añadió peróxido de hidrógeno (3% en agua) para bloquear a la peroxidasa endógena por 20 min. Se realizaron 3 lavados con buffer PBS/Tritón por 2 min cada una. Se añadió bloqueador de proteínas por 40 min. Se lavó 3 veces con buffer PBS/Tritón por 2 min cada una. Después se añadió el anticuerpo primario a la concentración adecuada y se incubó toda la noche (anti- PCNA y SDF-1). Después se recuperó el anticuerpo primario y se lavaron 3 veces con buffer PBS/Tritón por 2 min cada una. Después se añadió el anticuerpo secundario biotinilado e incubaron por 20 min. Se lavaron 3 veces con buffer PBS/Tritón X por 2 min cada una. Se añadió la estreptavidina conjugada con peroxidasa e incubaron por 20 min. Nuevamente se realizaron 3 lavados con buffer PBS/Tritón X por 2 min cada una. Después se añadió diaminobenzidina (DAB 10%) y se incubaron de 5 a 10 min. Después se lavaron con PBS y agua destilada. Se realizó una contratinción con hematoxilina de Gill por 2 min. Después se lavaron con agua por 20 s hasta que deje de teñirse. Se deshidrataron con alcoholes 95%, alcohol absoluto, alcohol/xilol por 15 s y se aclararon con 2 cambios de xilol, cada uno de 15 s y montaron con resina.

7.8. Fluorescencia de GFP en cortes en fresco

La otra parte del tejido hepático se incluyó en Tissue TEK O.C.T compound para realizar cortes en fresco de 5 μ m y así se observó la fluorescencia de la GFP en el tejido en el microscopio de fluorescencia.

7.8.1. Transducción con vector adenoviral

En una primera etapa 3 días post- trasplante se dio seguimiento a las MSC trasplantadas marcadas con GFP, expresado através de un vector adenoviral. Se sembró una cantidad conocida de células, éstas se adaptaron al plato de cultivo, pegaron y llegaron a un 80% de confluencia. Con ello se calculó la cantidad de vector necesario 50 multiplicidad de infección (MOI) por células y se les administraron a la rata vía intravenosa (Du et al., 2013).

7.9. Hibridación fluorescente in situ (FISH)

Seguimiento a las células trasplantadas mediante el rastreo del cromosoma Y de las células

madre implantadas.

Los requerimientos básicos de la Hibridación In Situ con Fluorescencia (FISH) son los siguientes:

- a) Sonda específica para la secuencia de interés.
- b) Mareaje fluorescente de la sonda que permita una detección apropiada.
- c) Espécimen biológico debidamente preservado para poder determinar la localización de la sonda marcada después de la hibridación.

El primer paso que se realizó fue colocar el hígado en buffer de formol al 10%. Posteriormente se embebieron en parafina y se realizaron cortes de 5 µm sobre portaobjetos de vidrio silanizados. Los portaobjetos se colocaron secuencialmente en xileno durante 15 minutos dos veces. Seguido en etanol al 100 % durante 5 min dos veces. Después se colocaron en buffer salino de citrato de sodio (SCC) 2X, pH 7 por 2 min a 73°C. Después se transfirieron los portaobjetos a una solución de 0.005% de Pepsina durante 10 min a 37°C. Como siguiente paso se realizó un lavado en PBS 1X durante 5 min a temperatura ambiente. Una vez lavados se fijaron en solución de formalina 2.5% durante 5 min a temperatura ambiente. Una vez fijados los portaobjetos con las muestras se les realizó nuevamente un lavado en PBS 1X el cual contenía pocas gotas de Glicina 1M pH 8.5 esto por un tiempo de 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se deshidrataron por inmersión secuencial durante 1 min en solución de etanol al 70%, 85% y 100% a temperatura ambiente. Seguido a esto se preparó la sonda de cromosoma Y de rata (IDRF1069, Empire genómica) 2 µL de la sonda prueba + 8 µL de buffer de hibridación. Se aplicaron 10 µL de la sonda previamente diluida y se cubrió con portaobjetos y selló con pegamento. Se colocó durante 2 min a 69 °C y posteriormente se realizó la hibridación a 37 – 42 °C en cámara húmeda durante 16 horas. Al finalizar el tiempo se realizó la post –hibridación para el cual se preparó solución SSC 0.4X con 0.3% Igepal se colocó en una jarra y calentó hasta que alcanzara una temperatura de 73°C. Una vez equilibrada la temperatura se removió cuidadosamente el pegamento y cubreobjetos de cada laminilla y se colocaron en la solución de SSC 2X con 0.1% Igepal a temperatura ambiente. Se agitaron periódicamente. Posteriormente se lavaron en solución caliente SSC 0.4X durante 2 min y transfirieron a solución SSC 2X e incubaron a temperatura ambiente durante 1 min. Seguido a esto se lavaron las laminillas

en agua destilada y dejaron secar. Una vez secas se realizó el montaje con VectaShield/DAPI y procedió a realizar el análisis en el microscopio utilizando la longitud de onda de excitación 499 nm y emisión 522 nm

7.10. Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como media \pm desviación estándar (DS) para una $n=3$ ratas por grupo experimental. Se empleó la prueba de T student, Dunet. Se consideró una $p<0.05$ como significativa. Los datos se analizaron con el programa estadístico SPSS 19.0.

CAPÍTULO VIII

RESULTADOS

8.1. Estandarización del modelo de daño hepático inducido por CCl₄ en ratas Wistar.

8.1.1. Experimento preliminar dosis 1 mL/kg de 10% de CCl₄

Con la dosis que se administró de 1 mL/kg de 10% de CCl₄ en aceite mineral vía intraperitoneal 3 veces por semana (Lee et al. 2005) durante 7, 10 y 12 semanas. En 3 ratas hembras Wistar se encontró una elevación de la enzima ALT al inicio 45 UI/L sin embargo, al realizar el análisis histológico se observó que a la semana 7 (78 UI/L) en el tejido hepático sólo se observaban microvesículas, a la semana 10 (110 UI/L) se observaron pequeñas fibras de colágena y a la semana 12 (119 UI/L) nuevamente sólo microvesículas (Figura 5).

Las tinciones realizadas a los tejidos de HyE al tiempo de sacrificio de cada rata.

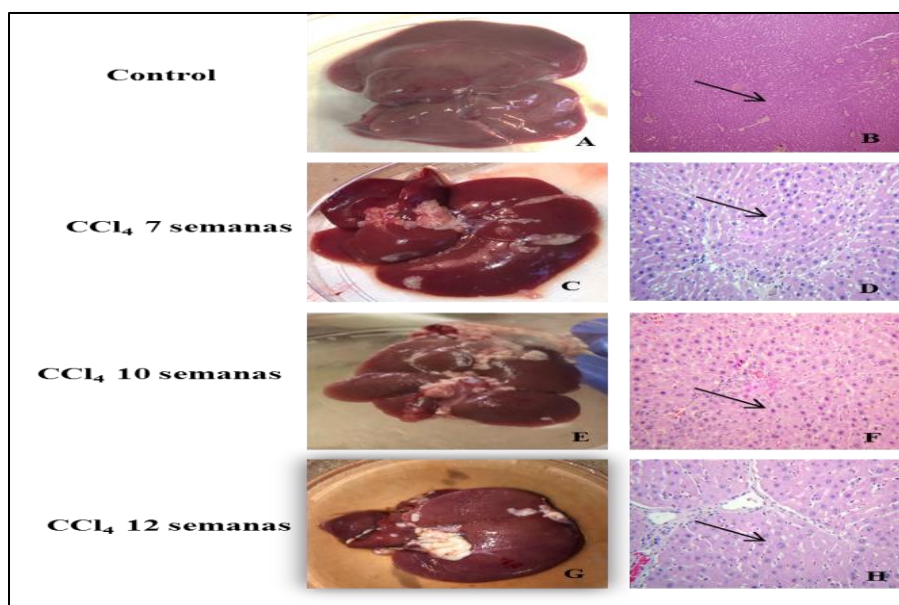


Figura 5. Anatomía y cortes histológicos de hígado. A.) Imagen anatómica del hígado control. B.) HyE Parénquima conservado. C.) Hígado con bordes regulares. D.) HyE 100x. Microvesículas. E.) Hígado con bordes irregulares. F.) HyE 100x. Pequeñas fibras de colágena. G.) Hígado con bordes regulares. H.) Microvesículas. Amplificación 100X

8.1.2. Aumento de dosis de CCl₄

El grupo de machos se sacrificó a las 11 semanas mostrando una elevación de la enzima ALT que se realizó cada 2 semanas: basal: 39 UI/mL, sem 2: 58 UI/mL, sem 4: 5707 UI/mL, sem 6: 4550 UI/mL, sem 8: 3173 UI/mL, sem 1: sem 10: 1133 UI/mL. Se observó un aumento en la parte abdominal, se les realizó una punción con jeringa y observamos que presentaba ascitis. El hígado mostró una superficie micronodular (Figura 6C). La tinción de HyE mostró microvesículas y puentes de colágena (Figura 6 H).

Los grupos de hembras se sacrificaron a la semana 12 y 13 tuvieron un comportamiento muy similar, mostraron una elevación de la enzima ALT: basal: 37 UI/mL, sem 2: 531 UI/mL, sem 4: 316 UI/mL, sem 6: 2511 UI/mL, sem 8: 3254 UI/mL, sem 10: 3096 UI/mL, sem 11: 1054 UI/mL, sem 12: 618 UI/mL, sem 13: 449 UI/mL. A partir de la semana 5 se observó un aumento en la parte abdominal se realizó punción abdominal y también se observó líquido de ascitis. El hígado mostró apariencia micronodular en ambos grupos y la histología reveló distorsión del parénquima hepático y presencia de puentes de colágena (Figura 6 E, F, G, H)

En los 3 grupos la sobrevivencia de los grupos fue del 50%.

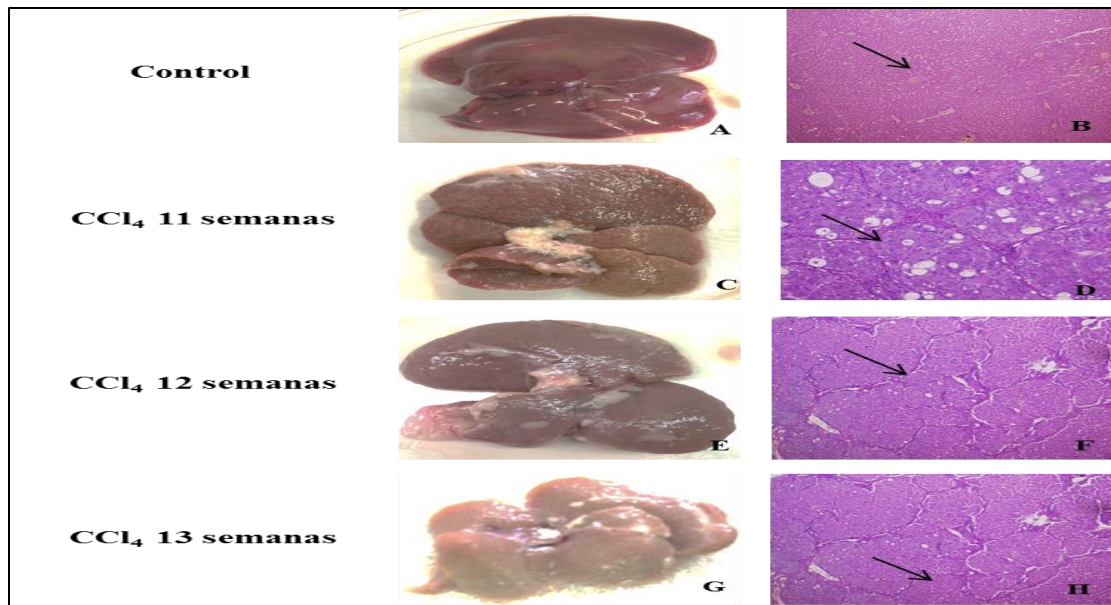


Figura 6. Imagen anatómica e histología a diferentes semanas de establecimiento del daño hepático. A.) Imagen anatómica del hígado con bordes regulares. B.) Tinción HyE 100x Parénquima conservado. C.) Hígado con superficie micronodular. D.) Tinción HyE 100x. Microvesículas y puentes de colágena. E.) Hígado con superficie micronodular. F.) Tinción HyE 100x. Presencia de puentes de colágena. G.) Hígado cirrótico. H.) Tinción HyE Distorsión del parénquima hepático, presencia de puentes de colágena.

8.1.3. Aumento gradual de dosis de CCl₄ + Pentobarbital 0.3g/L en la bebida.

Se inició con un grupo de 7 ratas Wistar hembras, se realizó la determinación de ALT cada semana: basal: 60 UI/mL, sem 2: 357 UI/mL, sem 3: 699 UI/mL, sem 4: 418 UI/mL, sem 5: 319 UI/mL, sem 6: 737 UI/mL, sem 7: 101 UI/mL. Las ratas presentaron asictis, se corroboró con punción abdominal. La sobrevivencia de las ratas fue muy baja a la semana 5 murieron 3 ratas, y en la semana 6 murieron 3 ratas, únicamente sobrevivió 1 rata en la cual el hígado se observó con apariencia micronodular, y la tinción de HyE mostró puentes de colágena (Figura 7).

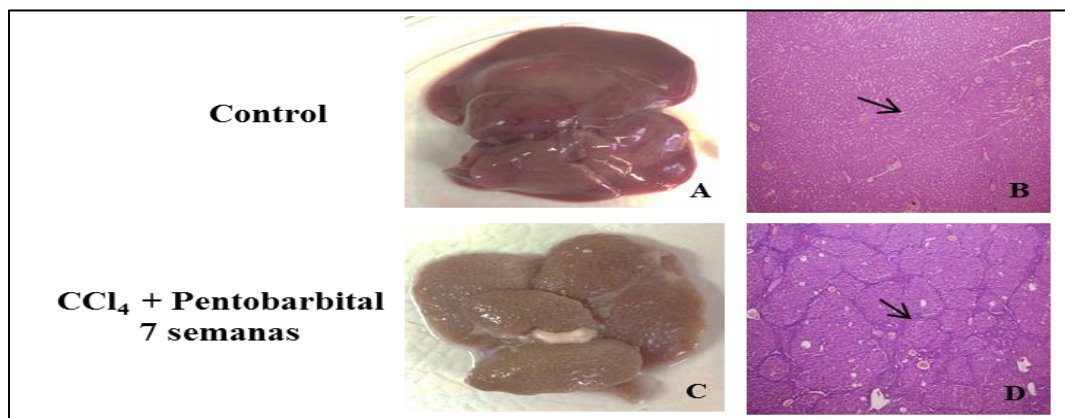


Figura 7. Imagen anatómica e histológica del hígado con daño hepático. A.) Hígado sano. B.) Tinción HyE 100x. Parénquima conservado. C.) Hígado con superficie micronodular. D.) Tinción HyE 100x. Puentes de colágena.

8.1.4. CCl₄ con esquema de dosis aumentado por semana.

Con el esquema de dosis de: 500 mg, 570 mg, 610 mg, 850 mg, 1000 mg por kg de peso en 250 μ L de aceite mineral; con frecuencia de 3 veces por semana y la última dosis administrada por un total de 4 semanas vía intraperitoneal, se logró llegar a la etapa de cirrosis hepática en la semana 8. La ALT mostró un aumento significativo ($p < 0.01$) a la semana 8 (Figura 8).

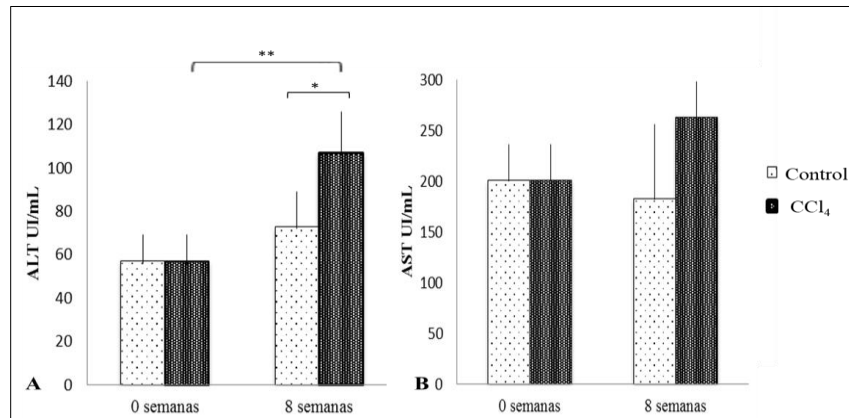


Figura 8. Determinación de enzimas hepáticas en el modelo experimental. A. ALT. B. AST. Media \pm DE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Los factores de crecimiento como el HGF no mostraron diferencia estadísticamente significativa al comparar el valor inicial versus la semana 8. Por otro lado, el TGF- β mostró un aumento significativo a la semana 8 ($p < 0.001$) (Figura 9).

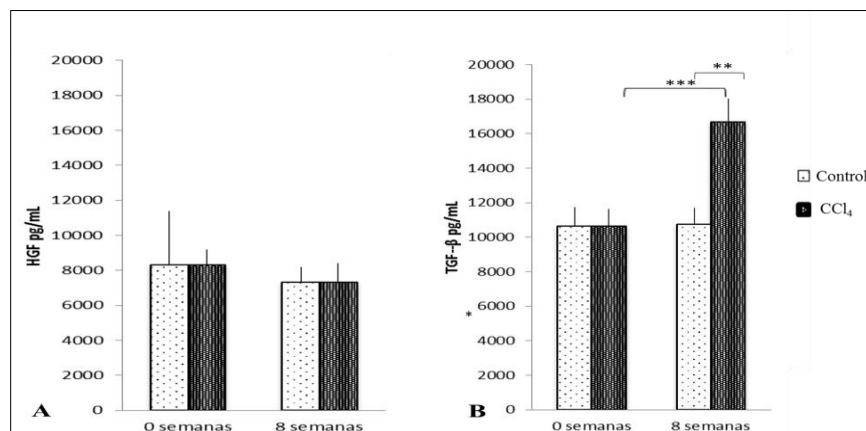


Figura 9. Determinación de factores de crecimiento en el modelo experimental. A. HGF. B. TGF- β . Media \pm DE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α mostraron un aumento significativo a la semana 8 ($p<0.0001$) (Figura 10).

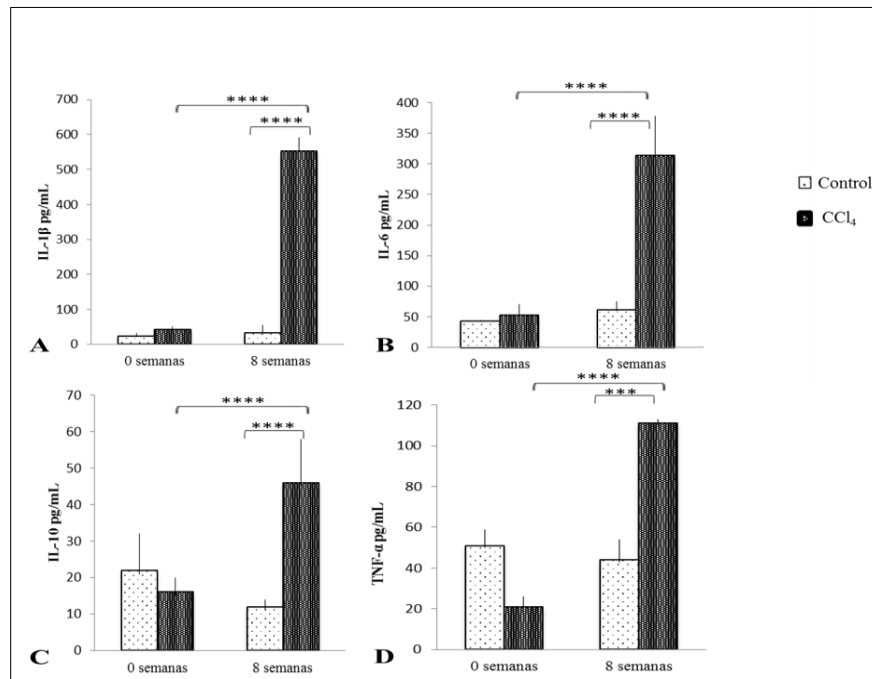


Figura 10. Determinación de citocinas en el modelo experimental. A. IL-1 β . B. IL-6. C. IL-10 D. TNF- α . Media \pm DE. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

La histología demostró como resultado la presencia evidente de los puentes de colágeno y confirmando por las tinciones de TM y RS (Figura 11).

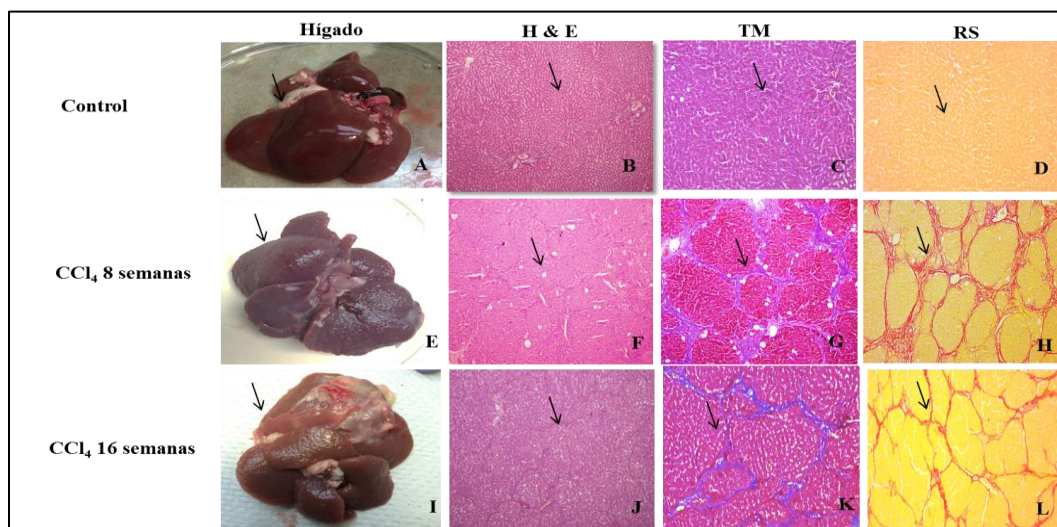


Figura 11. Imágenes anatómicas e histológicas del modelo de daño hepático establecido. A) Hígado

con bordes regulares. B) HyE 100X Parénquima conservado. C) TM 100X. Ausencia de tejido fibroso. D) Ausencia de fibras de colágena. E) Hígado con superficie micronodular. F) HyE 100X. Degeneración hepatocelular y distorsión arquitectural. G) TM 100X Resalta la presencia de los puentes de colágena de la cirrosis. H) RS 100X Resalta la presencia de puentes de colágena. I) Hígado cirrótico. J) HyE 100X Distorsión de la arquitectura del parénquima hepático. K) TM 100X Presencia de puentes de colágena. J) RS 100X Presencia de puentes de colágena.

8.2. Células derivadas de tejido adiposo expresan MSC CD90⁺ y CD105⁺

A partir de una placa de 75 cm², al 70-80% de confluencia, por células adherentes de apariencia fusiforme derivadas de tejido adiposo, con tres pasajes de cultivo, se obtuvo el ARN total para la evaluación de la expresión relativa de marcadores específicos para MSC por PCR en tiempo real. CD90 y CD105 marcadores específicos de MSC, presentaron una expresión de 60.5 ± 0.1 y 24.8 ± 0.1 % de la expresión del ARNm de β -actina respectivamente. Mientras que los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45 representan solo el 4 ± 1.5 y 10.4 ± 0.4 % de la expresión de β -actina respectivamente (Figura 12).

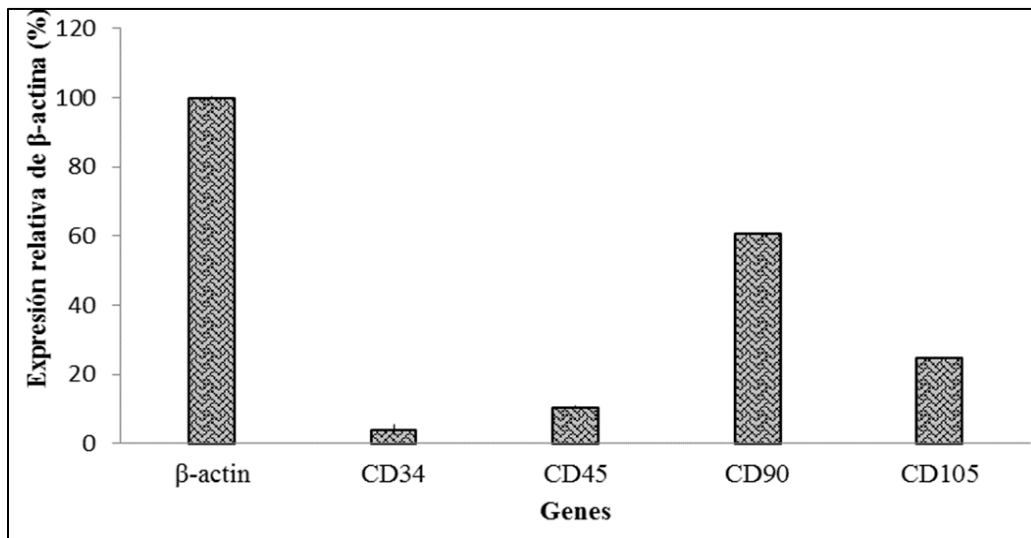


Figura 12. Expresión génica de marcadores de MSC. Expresión alta de CD90⁺, CD105⁺, y baja de CD34⁺, CD45, β -actina considerado como gen de expresión endógena Valores expresados en media \pm DE (n=3).

8.2.1. Expresión del receptor CXCR4 en MSC de tejido adiposo

Se observó expresión de la β -actina a 43 kDa en el control positivo y en las muestras de MSC. Al analizar la expresión de CXCR4 en el gen endógeno y muestras analizar se encontró que en las células Hela (control positivo) el porcentaje de expresión fue de 31.2

% y en MSC de tejido adiposo en pasaje 3 el porcentaje de expresión fue de $23.5 \% \pm 4.98$ (Figura 13).

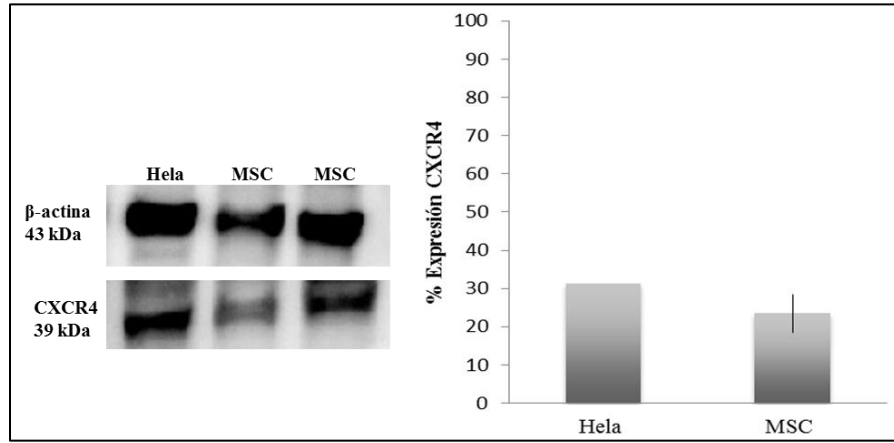


Figura 13. Western blot receptor CXCR4 en MSC. A. Expresión de CXCR4. B. Porcentaje de expresión de CXCR4 en MSC. Media \pm DE (n=2).

8.3. Determinación de población CD34⁺

La población de CD34⁺ se analizó antes y 24 horas después del tratamiento con G-CSF. El tratamiento indujo una significativa movilización de células hematopoyéticas CD34⁺ en: CCl₄ + G-CSF ($0.20 \pm 0.17\%$ antes vs. $1.50 \pm 0.50\%$ después del tratamiento, $p < 0.01$) y CCl₄ + G-CSF + MSC ($0.57 \pm 0.25\%$, antes vs. $1.70 \pm 0.36\%$ después del tratamiento, $p < 0.05$). No encontramos diferencias en el control ($0.20 \pm 0.10\%$ antes vs. $0.21 \pm 0.05\%$ después de la solución salina, $p = \text{NS}$) o CCl₄ ($0.13 \pm 0.06\%$, antes vs. $0.16 \pm 0.05\%$, después de la solución salina, $p = \text{NS}$).

Tabla 2.

Tabla 2. Determinación CD34⁺ antes vs después de la movilización en cada grupo experimental.

Grupos experimentales	CD34 ⁺ antes de movilización	CD34 ⁺ después de movilización
Control	0.20 ± 0.10	0.21 ± 0.05
CCl ₄	0.13 ± 0.06	0.16 ± 0.05
CCl ₄ + G-CSF	0.20 ± 0.17	1.50 ± 0.50 **
CCl ₄ + MSC	0.26 ± 0.05	0.73 ± 0.20
CCl ₄ + G-CSF + MSC	0.57 ± 0.25	1.70 ± 0.36 *

Valores son expresados como media \pm DE (n=3). Los símbolos, *, ** representan la significancia estadística $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente.

8.4. Niveles de transaminasas en suero

AST y ALT disminuyeron significativamente en los grupos tratados con CCl₄ + G-CSF y CCl₄ + MSC en comparación con el grupo CCl₄ a las 16 semanas ($p < 0.001$). Además, la AST disminuyó en CCl₄ + G-CSF + MSC ($p < 0.05$) en comparación con el grupo CCl₄ (Figura 14 A, B).

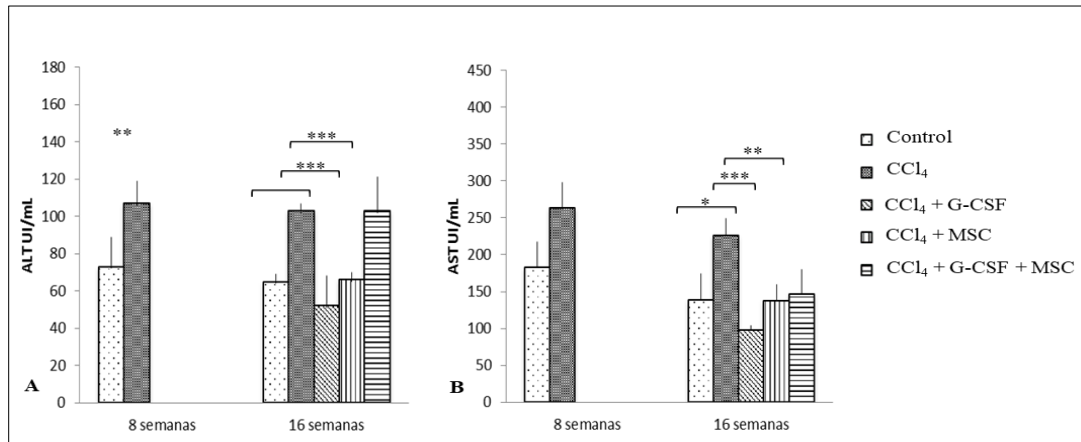


Figura 14. Niveles en suero de transaminasas a las 8 y 16 semanas en los grupos tratados. A. Alanino aminotransferasa (ALT); **B.** Aspartato aminotransferasa (AST). Media \pm DE (n=3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

8.5. Determinación de los cambios séricos de factores de crecimiento (HGF y TGF- β) y citocinas (IL1- β , IL6, IL-10 y TNF α).

Los niveles de HGF del control positivo (CCl₄) se mantuvieron similares en a las 8 y 16 semanas ($p = \text{NS}$) (Figura 15 A), mientras que disminuyeron significativamente a las 16 semanas en CCl₄+G-CSF ($p < 0.01$). Niveles de HGF aumentaron significativamente en CCl₄+MSC a las 16 semanas en comparación con el grupo CCl₄ ($p < 0.05$) (Figura 15 A). En el grupo control no hubo diferencia significativa en el TGF- β 8 vs 16 semanas. Sin embargo, mostró una disminución significativa en los niveles de TGF- β entre 8 y 16 semanas en el grupo CCl₄ ($p < 0.01$). A las 16 semanas se observó una disminución significativa en los niveles de TGF- β en CCl₄ + MSC ($p < 0.01$) y CCl₄ + G-CSF + MSC ($p < 0.05$) (Figura 15 B).

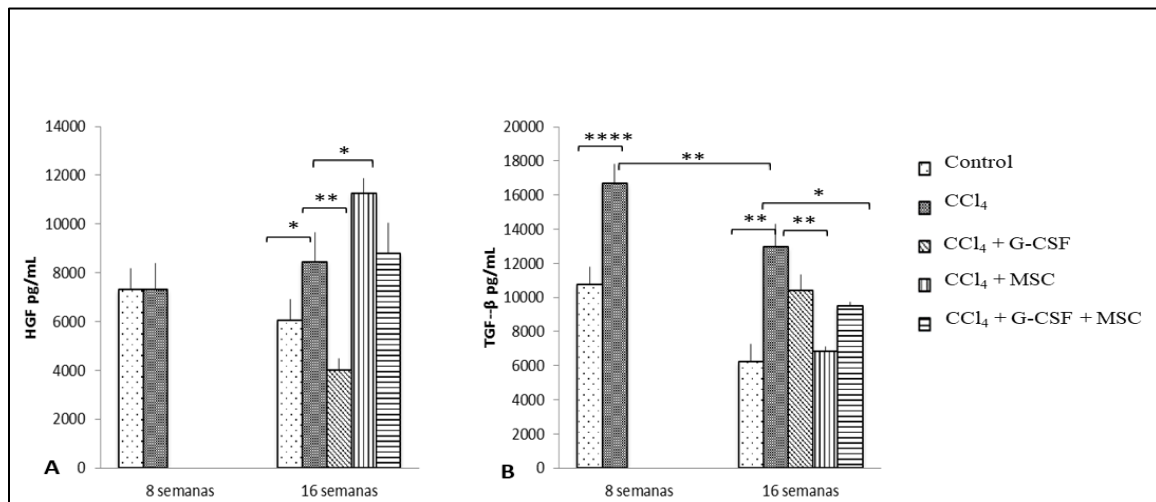


Figura 15. Niveles de factores de crecimiento a las 8 y 16 semanas en los diferentes grupos de estudio. A. Factor de crecimiento de hepaocitos (HGF); B. Factor transformante beta (TGF-β). Media ± DE, (n=3). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

Una recuperación natural en IL-1β e interleucina 6 pareció ocurrir a las 16 semanas (p < 0.001) en el grupo CCl₄ (Figura 16 A, B). Sin embargo, los tres grupos de tratamiento tuvieron disminuciones significativas en IL-1β (p < 0.001) (Figura 16 A), en contraste con los niveles de interleucina 6 que no fueron alterados por los grupos de tratamiento (Figura 16 B). IL-10 se incrementó a las 16 semanas en todos los grupos de tratamiento: CCl₄+G-CSF (p < 0.05), CCl₄+MSC, y CCl₄+G-CSF+MSC frente a CCl₄ (ambos p < 0.001) (Figura 16 C). Los niveles de TNF-α disminuyeron en todos los grupos de tratamiento: CCl₄+G-CSF (p < 0.05), CCl₄+MSC, y CCl₄+G-CSF+MSC (ambos p < 0.001) (Figura 16 D).

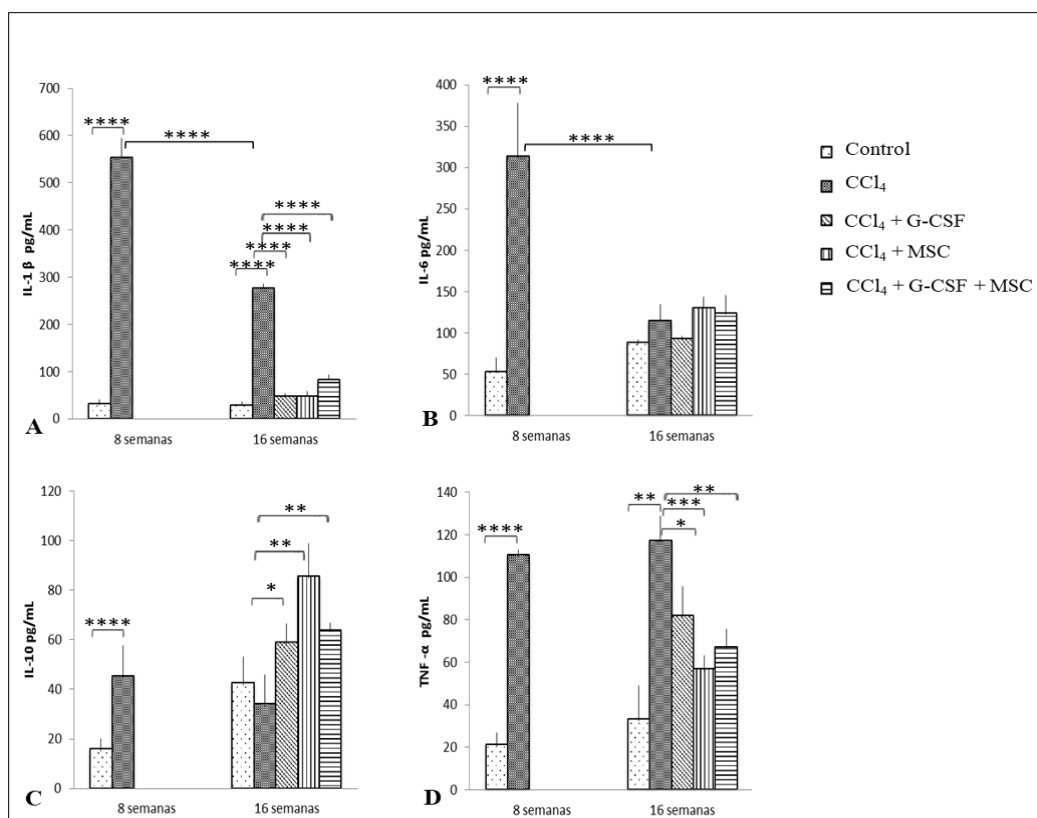


Figura 16. Niveles de citocinas a las 8 y 16 semanas en los diferentes grupos de estudio. A. Interleucina 1 β (IL-1 β); B. Interleucina 6 (IL-6); C. Interleucina 10 (IL-10); D. Factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Media \pm DE (n=3). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

8.6. Análisis histopatológico

El grupo CCl₄ mostró degeneración hepatocelular, con presencia de nódulos medianos y pequeños con bandas fibrosas bien formadas a las 8 semanas (METAVIR F4) (Figura 17 D, E, F). Sin embargo, a las 16 semanas se observó fibrosis en puente con la presencia de nódulos medios con bandas fibrosas delgadas (METAVIR F3) (Figura 17 G, H, I). A las 16 semanas, los grupos CCl₄+G-CSF y CCl₄+MSC mostraron presencia de septos y puentes finos (METAVIR F2) vs CCl₄ a las 8 semanas (Figura 17 J, K, L, M, N, O). A las 16 semanas, el grupo CCl₄+G-CSF+MSC mostró presencia de septos, puentes delgados, pequeños y nódulos medianos, y disminución de la fibrosis a F3 frente a CCl₄ en 8 semanas, pero no se encontraron diferencias en comparación con el grupo CCl₄ a las 16 semanas (METAVIR F3) (Figura 17 P, Q, R).

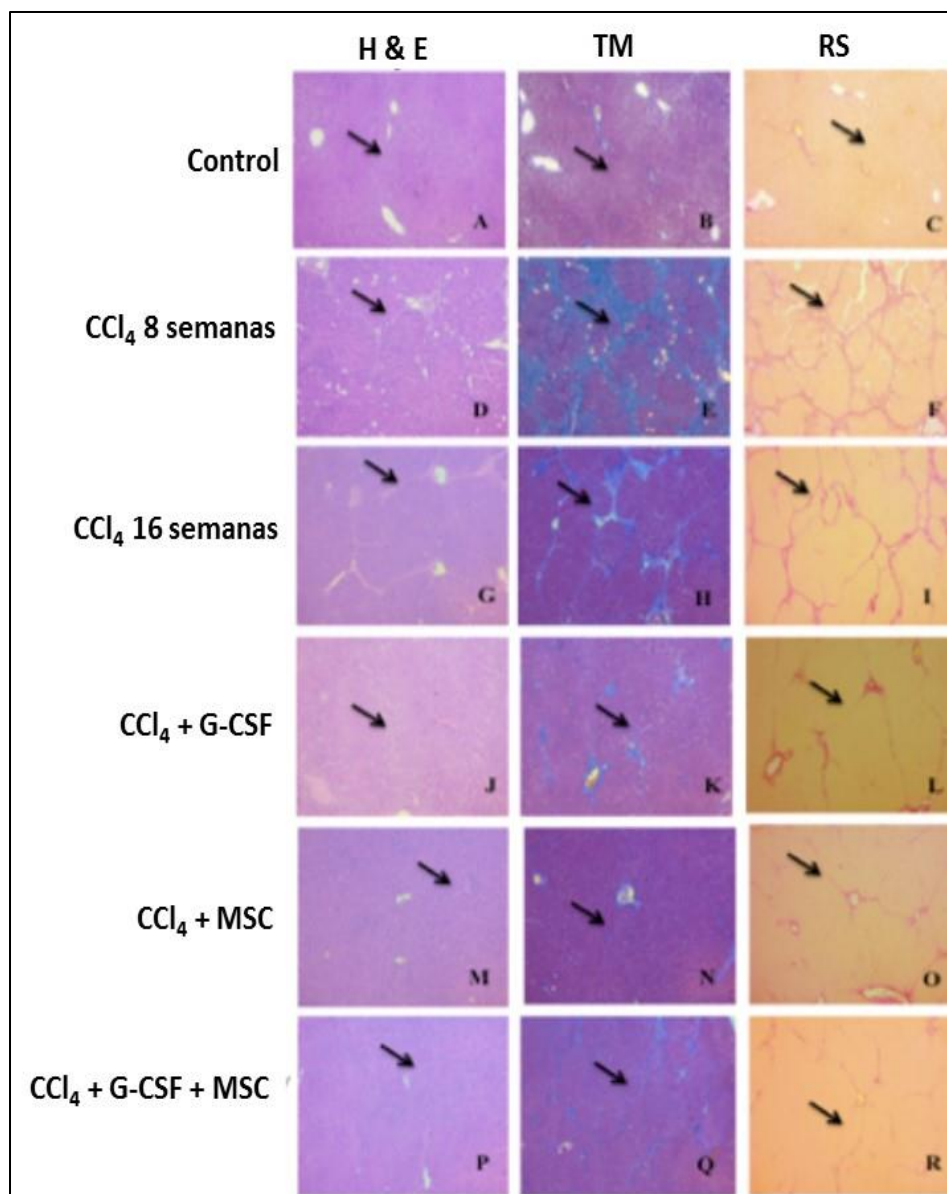


Figura 17. Fotomicrografías de tejido hepático tratado con seguimiento a las 8 y 16 semanas. Lado izquierdo H&E; centro TM; derecha RS. A,B,C: grupo control. D,E,F: CCl₄ 8 semanas. G,H,I: CCl₄ 16 semanas. J,K,L: CCl₄ + G-CSF. M,N,O: CCl₄ + MSC. P,Q,R: CCl₄ + G-CSF + MSC. Amplificación (100x).

En el grupo CCl₄ el porcentaje de colágeno se incrementó significativamente en $20.81 \pm 0.31\%$ a la semana 8 en comparación con el grupo control, $0.67 \pm 0.01\%$ ($p < 0.0001$). En el primero, hubo una reducción espontánea de la cuantificación de colágeno a $7.81 \pm 0.68\%$ a las 16 semanas ($p < 0.001$). Sin embargo, en los grupos tratados hubo una reducción adicional de colágeno a las 16 semanas: CCl₄+G-CSF $2.02 \pm 0.45\%$; CCl₄+MSC $2.32 \pm 0.22\%$; CCl₄+G-CSF+MSC $3.57 \pm 0.29\%$ ($p < 0.001$) (Figura 18).

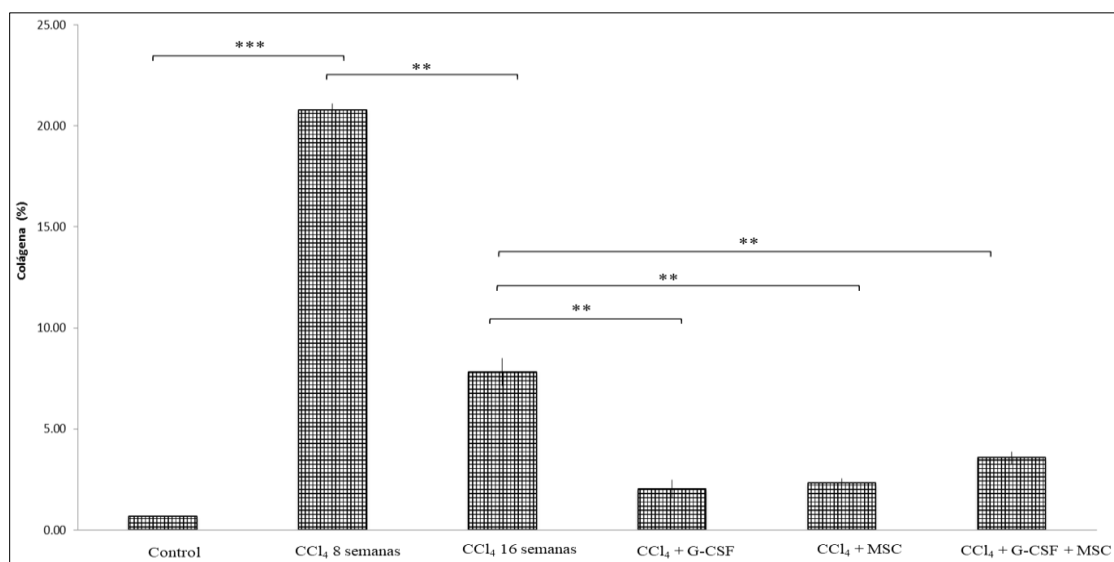


Figura 18. Cuantificación de colágena en tejido hepático en los grupos evaluado después del tratamiento a las 16 semanas. Cuantificación del porcentaje de colágena teñido con rojo sirius. Diferencia estadísticamente significativa en los diferentes grupos de estudio. Media \pm DE (n=3). ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05.

8.7. Actividad proliferativa

En el grupo CCl₄, la expresión de PCNA disminuyó ($p < 0.05$) a las 8 y 16 semanas en comparación con el grupo control. En los grupos tratados, la expresión de PCNA aumentó significativamente en CCl₄+G-CSF ($p < 0.001$), CCl₄+MSC ($p < 0.001$) y CCl₄+G-CSF+ MSC ($p < 0.05$) en comparación con grupo CCl₄ a las 16 semanas (Figura 19).

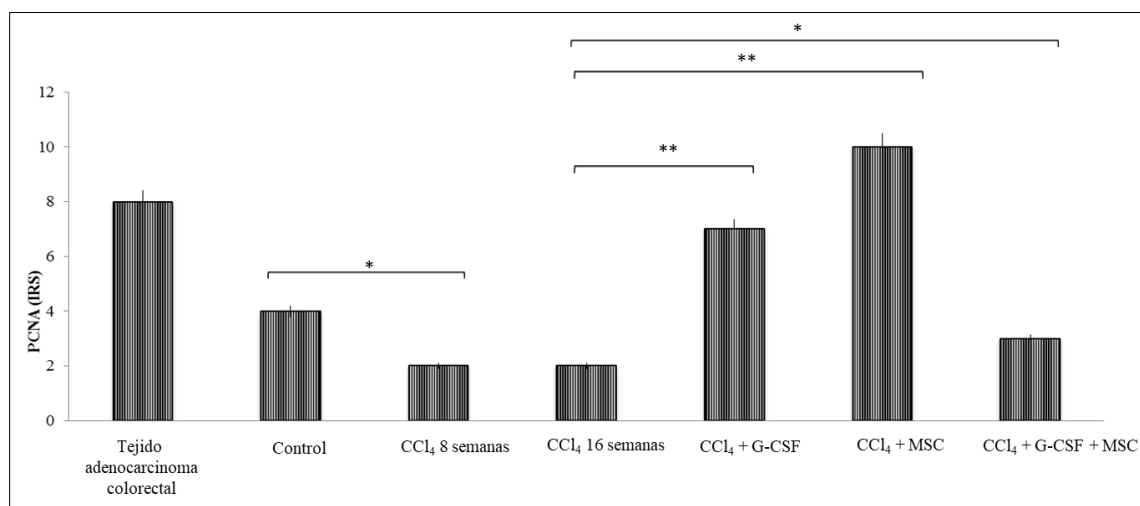


Figura 19. Análisis de inmunohistoquímica de PCNA en tejido hepático en los grupos evaluado

después del tratamiento a las 16 semanas. Inmunohistoquímica del antígeno de proliferación celular (PCNA) en tejido hepático: evaluación de la intensidad de la tinción. Diferencia estadísticamente significativa en los diferentes grupos de estudio. Media \pm DE, n=3. *p<0.05, **p<0.001.

8.8. Expresión de SDF-1

En el grupo CCl₄ la expresión del SDF-1 aumentó a las 8 semanas mostró una p<0.001 al compararlo con el grupo CCl₄ 16 semanas y grupo control. En los grupos tratados se observó una disminución en CCl₄ + G-CSF (p<0.001), CCl₄ + MSC (p<0.001), y en el grupo CCl₄ + G-CSF + MSC no se encontró diferencia estadísticamente significativa al compararlos con el grupo CCl₄ 16 semanas. Al comparar los grupos CCl₄ + G-CSF vs CCl₄ + MSC no se observó diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, se encontró una disminución con una p<0.001 al comparar CCl₄ + G-CSF vs CCl₄ + G-CSF + MSC y en el grupo CCl₄ + MSC vs CCl₄ + G-CSF + MSC con una p<0.001 (Figura 20).

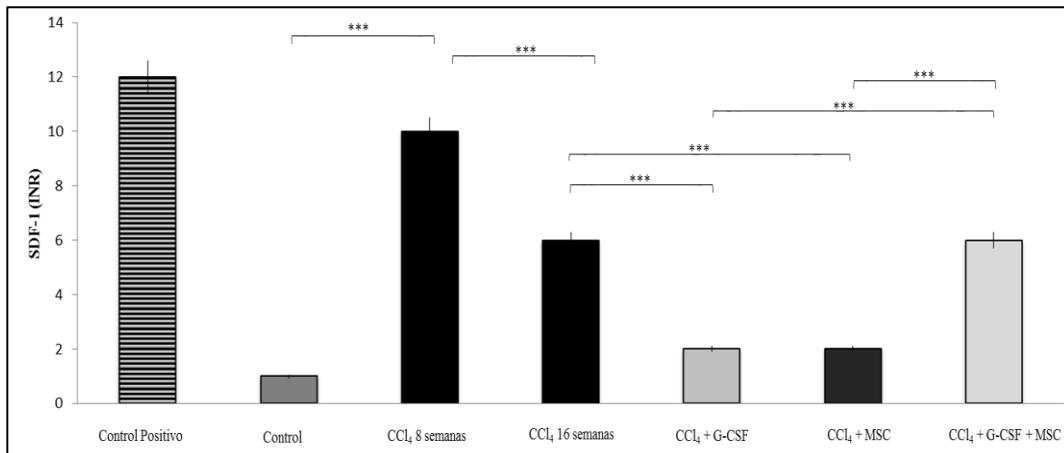


Figura 20. Inmunohistoquímica de SDF-1 en tejido hepático 8 y 16 semanas. Evaluación de la intensidad de la tinción. Diferencia estadísticamente significativa en los diferentes grupos de estudio. Media \pm DE, n=3. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

8.9. Reclutamiento de las células madre mesenquimales en dos etapas

8.9.1. Reclutamiento MSC marcadas con GFP 3 días post-trasplante

El análisis de las MSC solo se realizó en manera cualitativa, las cuales se observaron únicamente en el CCl₄ + MSC – GFP 3 días post-trasplante (Figura 21 A), en el grupo Control + MSC-GFP no se observaron células fluorescentes en el tejido hepático (Figura 21 B), en el grupo control tampoco se observó fluorescencia (Figura 21 C).

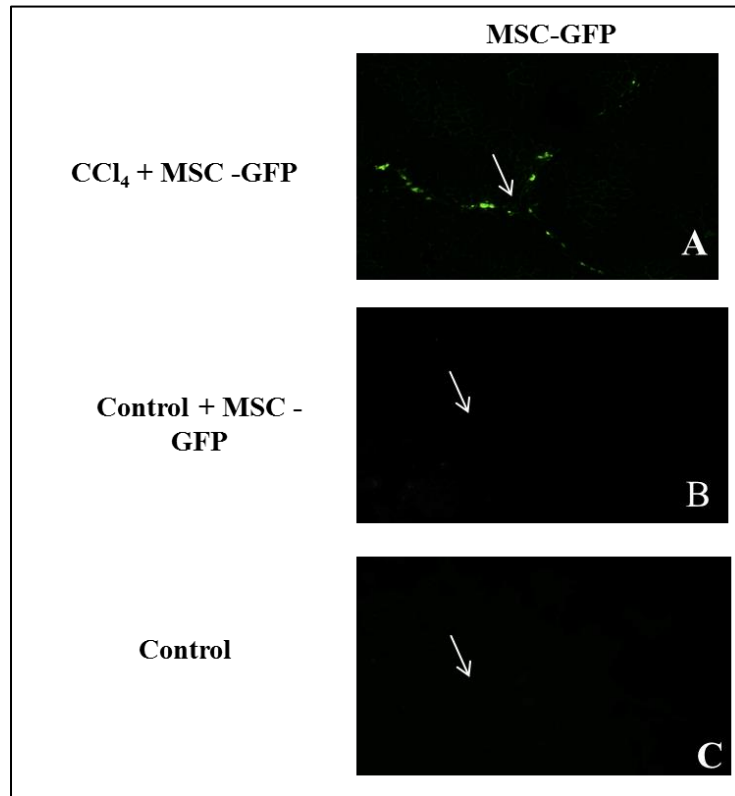


Figura 21. Reclutamiento MSC-GFP 3 días post-trasplante. A) Identificación de MSC-GFP en zonas de daño de parénquima B) Ausencia de MSC- GFP. C) Ausencia de Fluorescencia.

8.9.2. Rastreo del cromosoma Y mediante FISH a largo plazo en el modelo experimental

El rastreo del cromosoma Y mediante Fish se realizó 60 días post trasplante de las MSC. En el control negativo únicamente se mostró la tinción por DAPI a los núcleos de las células. Se observó la presencia del cromosoma Y en el control positivo. El análisis en los grupos CCl_4 + MSC y CCl_4 + G-CSF + MSC se realizó únicamente en forma cualitativa en el cual se observó presencia en ambos (Figura 22).

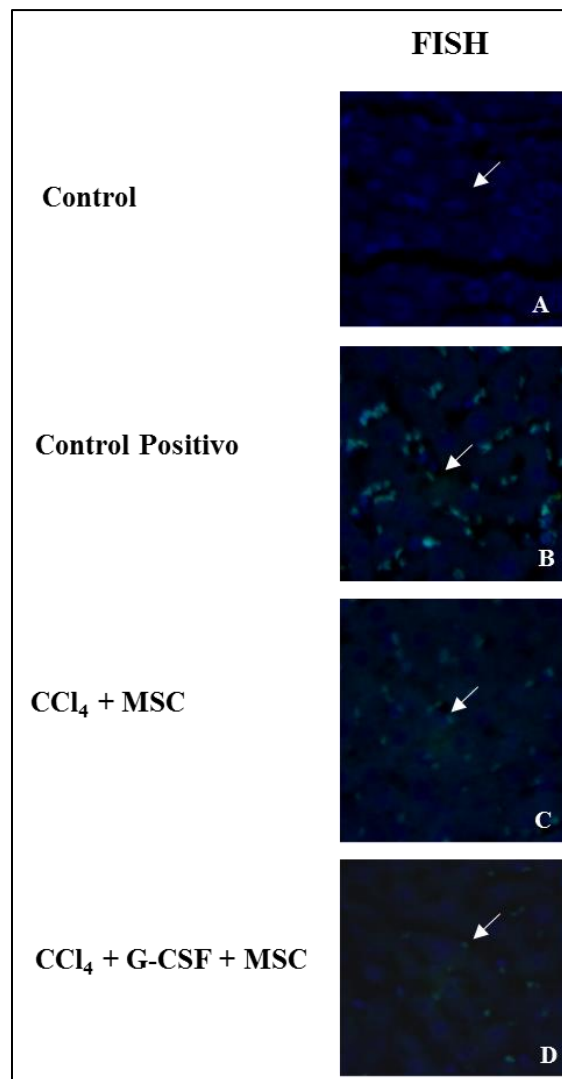


Figura 22. Rastreo del cromosoma Y mediante FISH. A) Identificación de núcleos (DAPI) en tejido hepático. B) Control positivo. Identificación cromosoma Y (utilizando sonda verde cromosoma Y) contratinción para núcleos (DAPI). C) CCl_4 + MSC identificación de cromosoma Y marcado con sonda

verde fluorescente y contratinción de núcleos con DAPI. D) CCl₄ + G-CSF + MSC identificación de cromosoma Y marcado con sonda verde fluorescente y contratinción de núcleos con DAPI.

CAPÍTULO IX

DISCUSIÓN

El tratamiento aislado con MSC derivadas de AT mostró una mejoría mayor en función hepática en comparación con el tratamiento de movilización de HSC inducido con G-CSF. MSC tuvo los mejores resultados al comparar las tres terapias contra el control positivo, en HGF, TGF- β e IL-10 ($p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.01$, respectivamente). Sin embargo, no se observó diferencia en el análisis histopatológico o cuantificación de colágena. Los niveles de HGF y TGF- β reflejaron las mejores condiciones para el proceso de regeneración; esto puede verse antes de los cambios histológicos. Se observó una menor mejoría cuando se combinaron estas terapias. En todos los grupos de tratamiento, IL-1 β y TNF- α disminuyeron, probablemente reflejando un efecto antiinflamatorio. Asimismo, se observó una elevación en IL-10, que pudo reflejar la regulación de las citocinas inflamatorias. Además, el tratamiento de la cirrosis experimental con MSCs estimularon los niveles mas elevados de HGF e inhibieron los niveles de TGF-B, esto podría reflejar una mejor capacidad de homing de las MSC que las HSC.

MSC derivadas de AT se caracterizaron por adherencia al plástico y expresión de marcadores específicos según lo reportado por Lofty et al., quienes mostraron alta expresión de CD90 y CD105 y baja expresión de CD34 y CD45 (Lofty et al., 2014).

En estas células se ha reportado la expresión de receptores en la membrana los cuales juegan un papel importante en el homing de la MSC. Entre algunos de ellos uno de los más estudiados es el receptor CXCR4 el cual se ha encontrado expresado en MSC de médula ósea y tejido adiposo. En nuestros resultados se observó expresión del receptor CXCR4 en las MSC en pasaje 3. Este resultado es similar a lo que reporta Alexeev et al., quienes mencionaron que la expresión de CXCR4 se observa en mayor expresión hasta el pasaje 4 (Alexeev et al., 2013). Baek et al., también reportaron la expresión de CXCR4 en MSC obtenidas de tejido adiposo en pasaje 3 (Baek et al., 2011).

Encontramos que el G-CSF induce la movilización de HSC que expresan marcadores de superficie CD34⁺. En consecuencia, Mark et al., (Mark et al., 2010) observó un aumento en población CD34⁺ en un modelo experimental agudo de CCl₄ utilizando G-CSF.

El aumento de enzimas hepáticas (ALT y AST), TGF- β (Muriel et al., 2003, Liu et al., 2015), IL-1 β y TNF- α citocinas proinflamatorias son parámetros asociados con daño hepático, fibrosis e inflamación activa (Manna et al., 2016, Rocha et al., 2014). De manera similar, en un modelo de lesión crónica de CCl₄ tratado con MSC (Li et al., 2013), hubo una mejora en función hepática y disminución de ALT y AST. Además, el tratamiento con G-CSF (Tsolaki et al., 2014) mejoró el daño hepático y disminuyó la ALT (Tsolaki et al., 2014, Liu et al., 2015, Li et al., 2013). La ALT es una enzima más específica de daño hepático que la AST. Sin embargo, en nuestro modelo, la mejora se reflejó en una disminución en la AST en todos los grupos de tratamiento, mientras que se observó una mejoría de ALT en CCl₄+G-CSF y CCl₄+MSC, pero no en CCl₄+G-CSF+MSC. Con estos experimentos, es imposible determinar por qué hay una respuesta diferente entre ALT y AST.

Una disminución en TGF- β puede estar asociada con fibrosis disminuida (Zhao et al., 2012). En nuestro modelo, tanto CCl₄+MSC (p <0.01) y CCl₄+G-CSF+MSC (p <0.05) grupos tuvieron un impacto significativo disminuyendo TGF- β . Los cambios en los niveles séricos de HGF y TGF- β pueden no reflejarse en la histología del hígado en nuestro modelo, posiblemente debido a que se utilizó un breve período de observación para definir si estos factores de crecimiento predicen la evolución de la fibrosis. En nuestro modelo, el aumento de HGF y la disminución de TGF- β en los tres grupos sugiere una respuesta adecuada al tratamiento, con HGF elevado que indica reparación y disminución de TGF- β que indica disminución de fibrosis.

Estudios in vitro han demostrado que las MSC en cultivo pueden producir HGF e inhibir las células hepáticas estelares (Yu et al., 2015) y estudios in vivo de fibrosis experimental han demostrado que las MSC aumentan los niveles de HGF circulantes (Yu et al., 2015, Li et al., 2013), lo que estimula la regeneración y aceleran la proliferación de hepatocitos (Yannaki et al., 2005, Liu et al., 2015). En el estudio actual, las MSC estimularon el mayor aumento de HGF, posiblemente reflejando reparación de daños. Además, PCNA

aumentó en MSC y G-CSF ($p < 0.001$) y G-CSF+MSC ($p < 0.05$). Li et al. (Li et al., 2013) abordó los efectos terapéuticos de MSC y HSC en un estudio de cirrosis experimental, y reportó que las MSC tenían una mayor capacidad de homing para los hígados dañados y mayor capacidad para promover la proliferación de hepatocitos.

En otro modelo de fibrosis hepática tratado con MSC (Zhao et al., 2012), IL-1 β y TNF- α disminuyeron, de manera consistente con nuestros hallazgos. También se ha demostrado previamente que el TNF- α disminuye con el tratamiento con G-CSF (Tsolaki et al., 2014). Además, en este estudio, la terapia combinada mostró una disminución significativa en TNF- α ($p < 0.0001$), posiblemente indicando un fuerte efecto antiinflamatorio.

Las MSC y las HSC tienen propiedades inmunomoduladoras y desempeñan funciones importantes en la lesión hepática. Los estudios de lesión renal y pulmonar y modelos de insuficiencia hepática fulminante han demostrado que la IL-10 juega un papel antiinflamatorio (Tögel et al., 2005, Ortiz et al., 2007, Pulavedran et al., 2010). Un posible papel antiinflamatorio de la IL-10 fue observado en todos los grupos de tratamiento. Estudios previos con un modelo similar con tratamiento MSC reportaron un incremento en IL-10 (Li et al., 2013, Zhao et al., 2012). Las discrepancias entre los estudios se relacionan con los mecanismos que median la inmunosupresión, que puede deberse a diferentes condiciones experimentales o al origen de las MSC (Ren et al., 2009). Aunque estos mecanismos no se entienden completamente, las MSC pueden inhibir la proliferación de células T, inhibir la producción de interferón gamma y TNF- α , e inducir un aumento en los niveles de interleucina 4 e IL-10. Acumulativamente, estos hallazgos indican una respuesta inmune proinflamatoria en un estado antiinflamatorio, que es favorecido por la estimulación de los linfocitos Treg y alteraciones en las actividades de las células dendríticas (Ren et al., 2009).

Las MSC también pueden interferir en la diferenciación, maduración y función de células dendríticas, causando un bloqueo en la inmaduración y alterando la secreción de citocinas. Por ejemplo, MSC pueden reducir la producción de citocinas proinflamatorias interleucina 12, interferón gamma, y TNF- α y aumenta la producción de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 (Jiang et al., 2005).

El tratamiento con MSC y G-CSF mejora la fibrosis hepática en los modelos de lesión hepática crónica CCl₄ (Yan et al., 2010, Meier et al., 2013, Ahamed et al., 2014). De manera similar, nuestros resultados mostraron una disminución de F4 a F2 en la puntuación de METAVIR y fibras de colágeno disminuidas, especialmente cuando los tratamientos se utilizaron por separado. Se han propuesto mecanismos por los cuales estas células podrían contribuir a la disminución de la fibrosis, incluyendo su diferenciación en hepatocitos, su fusión con hepatocitos endógenos, y un efecto paracrino proliferativo sobre los hepatocitos (Tang et al., 2015).

HSC participan en la proliferación y reparación hepática después de la lesión (Lagasse et al., 2000, Petersen et al., 1999, Schwatz et al., 2002, Alison et al., 2000, Theise et al., 2000), aunque las verdaderas contribuciones de células madre de BM para la regeneración hepática han sido cuestionadas (Yannaki et al., 2005, Wagers et al., 2002, Thorgerisson et al., 2006). Evidencia sugiere que en lugar de la transdiferenciación de HSC a células madre específicas de tejido o fusión de donante con células huésped, la reposición de tejidos dañados se produce a través de la activación de progenitores endógenos y mecanismos de reparación mediados por la secreción paracrina de factores solubles por BM células (Loffredo et al., 2011, Bird et al., 2013, Kishore et al., 2013). La inducción de HSC mediante el G-CSF, ha sido ampliamente investigado por su efecto en la regeneración hepática, tanto en modelos animales de lesión hepática (Quintana-Bustamante et al., 2006, Yannaki et al., 2005, Piscaglia et al., 2007) y ensayos clínicos (Yannaki et al., 2006, Gaia et al., 2006, Gordon et al., 2006).

En nuestro modelo, el grupo CCl₄ a las 8 semanas, comparado con el grupo CCl₄ a las 16 semanas, disminuyó de F4 a F3. En un estudio realizado por Muriel et al. (Muriel et al., 2005) señalan que el grado de fibrosis aumentó linealmente con la duración de tratamiento con CCl₄, pero la regresión espontánea de la fibrosis fue similar después de 2 o 3 meses de intoxicación crónica, y la interrupción de la toxina durante dos meses produjo una significativa pero relativamente pequeña reducción en la fibrosis.

El daño hepático está asociado con el reclutamiento de células inflamatorias y activación de células estelares lo cual resulta en una fibrosis progresiva. Se ha reportado que es necesaria la expresión del SDF-1 para la activación de células estelares (Hong et al., 2009). Nuestros resultados mostraron una mayor expresión de SDF-1 en el grupo CCl₄ 8

semanas, y posteriormente en el grupo CCl₄ 16 semanas se observó una disminución, sin embargo, al comparar este último grupo con los grupos CCl₄+ G-CSF y CCl₄+ MSC se encontró una menor expresión en estos dos grupos, lo cual no se observó en el grupo CCl₄+ G-CSF+ MSC. Similar a lo reportado por Sun et al., el nivel de SDF-1 estaba aumentado en el modelo con daño hepático agudo el cual disminuyó después del tratamiento con MSC obtenidas de médula ósea (Sun et al., 2014). Las MSC expresan el receptor de la quimiocina SDF-1/ CXCR4, ésta quimiocina estimula el reclutamiento de las células progenitoras en el tejido dañado (Honczarenko et al., 2006; Lapidot et al., 2001; Son et al., 2006; Sordi et al., 2005).

Se han explorado diversas rutas de trasplante de las MSC con el fin de seleccionar la más apropiada entre ellas la ruta intraperitoneal, arteria hepática, vena caudal (Sun et al., 2014; Du et al., 2013; Zhao et al., 2012) en éstos estudios se les ha dado seguimiento a las células con el fin de saber si ellas se reclutaron en el órgano dañado y ahí permanecieron. Nuestros resultados mostraron que las células marcadas con la GFP se localizaron en el hígado a los 3 días post-trasplante. Similar a lo reportado en un estudio de un modelo de hepatectomía en el cual trasplantaron MSC marcadas con la GFP y dieron seguimiento a los 3 días post-trasplante y las localizaron en el tejido hepático (Du et al., 2013).

Con el fin de dar un seguimiento prolongado a las células se realizó un FISH para localizar al cromosoma Y puesto que el trasplante de células se realizó de macho a hembra. Nuestros resultados mostraron que, si se localizaron MSC en el tejido hepático, en este caso el análisis se realizó únicamente en forma cualitativa, sin embargo, se apreció una mayor cantidad de células marcadas en el grupo CCl₄+ MSC vs CCl₄+G-CSF+MSC, a los 60 días post- trasplante. Hao et al., reportaron en un modelo de daño hepático agudo se realizó FISH (cromosoma Y) dando seguimiento a las MSC trasplantadas y se observó al paso del tiempo una mayor cantidad a los 21 días post-trasplante y a los 28 días disminuyó la cantidad de células marcadas (Hao et al., 2015). En otro estudio se obtuvo un resultado similar al obtenido en nuestros resultados al administrar MSC, HSC y HSC+MSC en un modelo con fibrosis hepática, se observó que hubo una mayor cantidad de células en el grupo CCl₄+ MSC a las 4 semanas post-trasplante (Li et al., 2013).

En este estudio, la combinación de G-CSF+MSC mostró una menor mejoría en comparación con el uso separado de MSC y tratamiento con G-CSF. No se observó un efecto sinérgico o aditivo. En anteriores estudios, se demostró un efecto sinérgico cuando las MSC en combinación con G-CSF fueron utilizados con éxito en tratamientos para la colitis ulcerosa en ratas, lo que sugirió que el G-CSF aumentó el reclutamiento de MSC (Tang et al., 2015). Sin embargo, en un estudio de Li et al. (Li et al., 2013), el efecto sinérgico de MSC y el tratamiento con HSC (derivado de BM no autóloga) no se observó en la lesión hepática; ellos obtuvieron mejores resultados con el grupo tratado con MSC que con el grupo tratado HSC en ratones. Nosotros utilizamos G-CSF para promover movilización autóloga HSC CD34⁺ como un posible incremento en el reclutamiento de AT MSC. Sin embargo, no observamos el efecto aditivo o sinérgico entre las MSC y las HSC las cuales fueron inducidas con el G-CSF en este modelo de cirrosis experimental. Sin embargo, estos experimentos no fueron diseñados para explicar algunos mecanismos.

En conclusión, nuestros resultados mostraron que el tratamiento con MSC mejoró la función hepática, disminuyó actividad inflamatoria, disminuyó la fibrosis hepática, desempeñó un papel antiinflamatorio, promovió la producción de HGF y aumentó el PCNA seguido de el tratamiento con movilización de HSC utilizando G-CSF.

Sin embargo, las terapias combinadas mostraron una menor mejoría en la fibrosis hepática. Será necesario realizar experimentos utilizando dosis más altas y frecuencias de administración mayor en los grupos experimentales los cuales permitirán evaluar la capacidad de estas terapias para reducir la fibrosis hepática.

CAPÍTULO X

CONCLUSIONES

Se estandarizó el modelo de cirrosis con el siguiente esquema de dosis: 500 mg, 570 mg, 610 mg, 850 mg, 1000 mg por kilogramo de peso ésta última durante 4 semanas. Las dosis se administraron con una frecuencia de 3 veces por semana en 250 μ L de aceite mineral vía intraperitoneal.

Se caracterizaron las MSC obtenidas de tejido adiposo de rata Wistar macho presentando los marcadores específicos de MSC como CD90⁺, CD105⁺ y menor proporción de CD34 y CD45.

Las MSC en pasaje 3 presentaron la expresión del receptor CXCR4 analizado mediante Western Blot.

La vía de administración de MSC por vena caudal, fue adecuada para realizar el trasplante de MSC observando las células a los 3 días post-trasplante en el tejido hepático.

El reclutamiento de MSC a largo plazo se observó en mayor grado en el grupo CCl₄ + MSC comparado con el grupo CCl₄ + G-CSF + MSC.

El tratamiento con MSC mostró un mayor potencial de disminuir la fibrosis, enzimas hepáticas, citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α), TGF- β , e incrementar el HGF, IL-

10 y expresión de PCNA; seguido por el tratamiento con G-CSF y por último G-CSF + MSC.

CAPÍTULO XI

PERSPECTIVAS

Comparar expresión de CXCR4 de MSC obtenidas de tejido adiposo en cultivo en pasaje 1, 2 y 3.

Analizar la expresión basal en plasma de CXCR4 antes de la inducción del daño hepático, post –daño hepático y durante el seguimiento post-trasplante de MSC y post-administración de G-CSF.

Es necesario realizar más experimentos incrementando la dosis y frecuencia de administración de MSC y G-CSF.

Aumentar el tamaño de muestra de los grupos para evaluar la eficacia de la terapia celular en la reducción de la fibrosis.

Evaluar el reclutamiento en diferentes tiempos en grupo a largo plazo cada 2 semanas hasta el sacrificio.

Seguir investigando una combinación efectiva de terapia celular en un el modelo de cirrosis hepática.

CAPÍTULO XII

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed SK, Mohammed SA, Khalaf G, Fikry H. 2014. Role of bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of CCL4 induced liver fibrosis in albino rats: A histological and immunohistochemical study. *Int J Stem Cells*, 7: 87-97.
2. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C. 1997. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J. Exp. Med* 185:111–120.
3. Ailhaud G., Grimaldi P. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu. Rev. Nutr* 12:207-233.
4. Aldeguer N, Debonera F, Shaker A. 2002. Interleukin 6 from intrahepatic cells of bone marrow origin is required for normal murine liver regeneration. *Hepatology* 35:40-48.
5. Alexeev, V., Donahue, A., Uitto, J., Igoucheva, O. 2013. Analysis of chemotactic molecules in bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the skin: Ccl27-

- Ccr10 axis as a basis for targeting to cutaneous tissues. *Cytherapy*, 15(2), 171-184.
6. Alison MR, Golding MH, Sarraf CE. 1996. Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree. *Cell Prolif* 29:373-402.
 7. Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, et al. 2000. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406: 257.
 8. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y. 2010. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med*. 5:4:617-31.
 9. Ashour FA., Abdou AG, EWIDA SF. 2014. Effect of Transplanted Mesenchymal Stem Cells on Liver Functions in Experimental Liver Fibrosis in Rats. *Med J Cairo Univ*, 82, 151-161.,.
 10. Baccarini U, Adani GL, Beltrami A. 2006. State of the art on human hepatocytes: isolation, preservation and clinical use. *Curr Opin Organ Transplant* 11:643-647.
 11. Baek SJ, Kang SK, Ra JC. 2011. In vitro migration capacity of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reflects their expression of receptors for chemokines and growth factors. *Experimental & molecular medicine*, 43; 10, 596-603.
 12. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y. 2008. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem cells* 26:10: 2705-2712.
 13. Baumann U, Crosby HA, Ramani P. 1999. Expression of stem cell receptor c-kit in normal and diseased paediatric liver. *Hepatology* 30:112-117.

14. Bird TG, Lu WY, Boulter L, Gordon-Keylock S, Ridgway RA, Williams MJ, Taube J, et al. 2013. Bone marrow injection stimulates hepatic ductular reactions in the absence of injury via macrophage-mediated TWEAK signalling. *Proc Natl Acad* 16: 6542–6547.
15. Bonora Centelles A, Pareja E., Gómez-Lechón. 2008. Terapia celular hepática: tipos celulares potencialmente útiles para el trasplante. *Gastroenterol Hepatol* 31:1:79-86
16. Burra P, Samuel D, Wendon J. 2004. Strategies for liver support: from stem cells to xenotransplantation. *J Hepatology* 41:1050-1059.
17. Cantz T, Manns MP, Ott M. 2008. Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell and tissue research*, 331(1), 271-282.
18. Chang YJ, Liu JW, Lin PC. 2009. Mesenchymal stem cells facilitate recovery from chemically induced liver damage and decrease liver fibrosis. *Life sciences* 85:13:517-525.
19. Clouston AD, Jonsson JR, Powell EE. 2009. Hepatic progenitor cell-mediated regeneration and fibrosis: chicken or egg?. *Hepatology* 49:1424-6.
20. Cordero P. 2007. Citocinas y Cirrosis hepática. En: *Hepatología. Desde la Biología Molecular al Diagnóstico, Tratamiento y Prevención*. Muñoz-Espinosa Ed. MacGrawHill. México, DF, pp 425-434.
21. Crosby HA, Hubscher SG, Joplin R. 1998. Immunolocalisation of OV-6, a putative stem cell marker in human fetal and diseased paediatric liver. *Hepatology* 28:980-985.

- 22.Crosby HA, Kelly DA, Strain AJ. 2001. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology* 120:534-544
- 23.Cura I. 2007. Síndrome colestásico en la edad pediátrica. En: *Hepatología. Desde la Biología Molecular al Diagnóstico, Tratamiento y Prevención*. Muñoz-Espinosa Ed. MacGrawHill. México, DF, pp 425-434.
- 24.Dar A, Kollet O, Lapidot T. 2006. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Experimental hematology*, 34(8), 967-975.
- 25.De Minicis S, Svegliati-Baroni G. 2011. Fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 5(2), 179-187.
- 26.De Silvestro G, Vicarioto M, Donadel C, Menegazzo M, Marson P, Corsini A. 2003. Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepato-gastroenterology*, 51(57), 805-810.
- 27.Dubois, Severine G. 2008. Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens. En *Mesenchymal Stem Cells*. Humana Press 69-79.
- 28.Du Z, Wei C, Yan J, et al. 2013. Mesenchymal Stem Cells Overexpressing C-X-C Chemokine Receptor Type 4 Improve Early Liver Regeneration of Small-for-Size Liver Grafts. *Liver Transplantation* 19:2:215-225.
- 29.El-Kader SMA, Al-Jiffri OH, Al-Shreef FM. 2014. Liver enzymes and psychological well-being response to aerobic exercise training in patients with chronic hepatitis C. *African health sciences*, 14(2), 414-419.

30. Esch JS, Knoefel WT, Klein M. 2005. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: A novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells* 23:463-470.
31. Escobedo M. 2007. Indicaciones y técnica quirúrgica del trasplante hepático. En: *Hepatología. Desde la Biología Molecular al Diagnóstico, Tratamiento y Prevención*. Muñoz-Espinosa Ed. MacGrawHill. México, DF.;469-487, pp.
32. Fausto N. 1994. *The liver: Biology and Pathobiology* New York: Raven Press Ltd 1501-1518.
33. Fausto N. 2002. Liver regeneration. *J Hepatol* 32:19-31.
34. Fausto N. 2004. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 39:1477-1487.
35. Ferrucci LM, Bell BP, Dhotre KB, Manos MM, Terrault NA, Zaman A, Desai MM. 2010. Complementary and alternative medicine use in chronic liver disease patients. *Journal of clinical gastroenterology*, 44(2), e40.
36. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z. 2006. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 24:150-154.
37. Friedman SL. 2003. Liver fibrosis-from bench to bedside. *J Hepatology* 38:S38-S53.
38. Furst G, Esch JS, Poll LW. 2007. Portal vein embolization and autologous CD133+ bone marrow stem cells for liver regeneration. *Radiology* 243:1:171-179.

39. Gaia S, Smedile A, Omedè P, Olivero A, Sanavio F, Balzola F, Ottobrelli A, et al. 2006. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *J Hepatol* 45: 13–19.
40. García G. 2001. Current management of complications of cirrhosis and portal hypertension: Variceal hemorrhage, ascites and spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology*. 2001;120: 726-748.
41. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F. 2010. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 15:1:1-2.
42. Gilchrist ES, Newsome PN, Dalakas E. 2005. Acetaminophen-induced fulminant hepatic failure results in an SDF-1 mediated ‘all or nothing’ haematopoietic stem cell response. *Hepatology* 42:744A–745A.
43. Gilchrist ES, Plevris JN. 2010. Bone marrow-derived stem cells in liver repair: 10 years down the line. *Liver Transpl.* 16:2:118-129.
44. Gimble J, Katz A, Bunnell B. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res* 100: 1249-1260.
45. Gehling UM, Willems M, Schlagner K. 2005. Partial hepatectomy induces mobilization of a distinct population of progenitor cells in healthy liver donors. *J Hepatology* 43:845-853.
46. Gordon MY, Levicar N, Pai M. 2006. Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells* 24:1822–1830.
47. Grisham JW, Thorgeirsson SS. 1997. In CS Potten. *Stem cells*. London. Academic

- Press 233-282.
- 48.Grompe M. 2003. The role of bone marrow stem cells in liver regeneration. *Semin Liver Disease* 23:4:363-371.
 - 49.Grompe M. 2014. Liver stem cells, where art thou?. *Cell stem cell*, 15(3), 257-258.
 - 50.Gruttadauria S, Grosso G, Pagano D. 2013. Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Restore Biochemical Markers of Acute Liver Injury in Experimental Model. *Transplantation Proceedings* 45:480–486
 - 51.Haddad M, Aliakbar. 2013. Evidence for crossing the blood barrier of adult rat brain by human adipose-derived mesenchymal stromal cells during a 6-month period of post-transplantation. *Cytotherapy* 2013;15:8:951-960.
 - 52.Haniffa MA, Wang XN, Holtick U. 2007. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol* 179:3:1595-1604.
 - 53.Hao NB, Li CZ, Lü MH, Tang B, Wang SM, Wu YY, Yang SM. 2015. SDF-1/CXCR4 axis promotes MSCs to repair liver injury partially through trans-differentiation and fusion with hepatocytes. *Stem cells international*, 2015.
 - 54.Hatch HM, Zheng D, Jorgensen ML, Petersen BE. 2002. SDF-1 α /CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning & Stem Cells*, 4(4), 339-351.
 - 55.Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Moore MA. 2001. Plasma elevation of stromal cell–derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*, 97(11), 3354-3360.

56. Hausman G, Hausman D. 2006. Search for the preadipocyte progenitor cell. *J. Clin. Invest* 116:3103-3107.
57. Hesami Z, Jamshidzadeh A, Ayatollahi M, Gramizadeh B, Vahdati A. 2016. The Comparative Effects of Human Mesenchymal Stem Cell and Platelet Extract on CCl₄-Induced Liver Toxicity in Rats. *Platelets*, 8, 9.
58. Honczarenko M, Le YI, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. 2006. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem cells*, 24(4), 1030-1041.
59. Hong F, Tuyama A, Lee T F, Loke J, Agarwal R, Cheng X, Branch A. 2009. Hepatic stellate cells express functional CXCR4: Role in stromal cell–derived factor-1 α –mediated stellate cell activation. *Hepatology*, 49(6), 2055-2067.
60. Itoh T, Miyajima A. 2014. Liver regeneration by stem/progenitor cells. *Hepatology* 1617-1626
61. Jang YY, Collector MI, Baylin SB. 2004. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 6:532-539.
62. Jewett A, Arasteh A, Tseng HC. 2010. Strategies to rescue mesenchymal stem cells (MSCs) and dental pulp stem cells (DPSCs) from NK cell mediated cytotoxicity. *Plos One* 5:3:e9874.
63. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte- derived dendritic cells. *Blood* 10: 4120-4126.
64. Jones R, Lebkowski J, McNiece I. 2010. Stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* Jan16:1:S115-S118.

- 65.Kasper, Braunwald, Fauci, Hauser, Longo, Jameson. 2005. *Medicina Interna Harrison*. 16a edición. 2:1992, 1993, 2046.
- 66.Khan AA, Shaik MV, Parveen N, Rajendraprasad A, Aleem MA, Habeeb MA, Venkateswarlu J. 2010. Human fetal liver-derived stem cell transplantation as supportive modality in the management of end-stage decompensated liver cirrhosis. *Cell transplantation*, 19(4), 409-418.
- 67.Kern S, Eichler H, Stoeve J. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *StemCells* 24:5:1294-1301.
- 68.Kershenobich D, Weissbrod B. Liver fibrosis and inflammation. 2003. A review. *Ann Hepatol* 2:159-163
- 69.Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS. 2008. Safety and efficacy of autologous bone marrow stem cell transplantation through hepatic artery for the treatment of chronic liver failure: a preliminary study. *Transplant Proc* 40:1140–1144.
- 70.Kholodenko IV, Yarygin KN. 2017. Cellular Mechanisms of Liver Regeneration and Cell-Based Therapies of Liver Diseases. *BioMed research international*, 2017.
- 71.Kinney MA, McDevitt TC. 2013. Emerging strategies for spatiotemporal control of stem cell fate and morphogenesis. *Trends in biotechnology*, 31(2), 78-84.
- 72.Kishore R, Verma SK, Mackie AR, Vaughan EE, Abramova TV, Aiko I, Krishnamurthy P. 2013. Bone marrow progenitor cell therapy-mediated paracrine regulation of cardiac miRNA-155 modulates fibrotic response in diabetic hearts. *PLoS One* 4: 1-3.

- 73.Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ. 2003. HGF SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 112:160–169.
- 74.Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, et al. 2003. Liver regeneration. *J Am Coll Surg* 197, 634-659.
- 75.Korbling M, Katz RL, Khanna A. 2002. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 346:738-746
- 76.Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M. 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med* 6:1229-1234.
- 77.Lapidot T. 2001. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 938(1), 83-95.
- 78.Lee GP, Jeong WI, Jeong DH. 2005. Diagnostic evaluation of carbon tetrachloride-induced rat hepatic cirrhosis model. *Anticancer Research*. 25;2A:1029-1038.
- 79.Lemmer ER, Shephard EG, Blakolmer K. 1998. Isolation from human fetal liver of cells coexpressing CD34 haematopoietic stem cell and CAM5.2 pancytokeratin markers. *J Hepatol* 29:450-454.
- 80.Liang P, Dong-Ying X, Bing-Liang L. 2011. Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Liver Failure Patients Caused by Hepatitis B: Short-Term and Long-Term Outcomes *Hepatology* 54:2:820-828
- 81.Li Q, Zhou X, Shi Y, Li J, Zheng L, Cui L, Fan D. 2013. In vivo tracking and comparison of the therapeutic effects of MSCs and HSCs for liver injury. *PloS one*, 8(4), e62363.

- 82.Liu J, Zhang Q Y, Yu LM, Liu B, Li MY, Zhu RZ. 2015. Phycocyanobilin accelerates liver regeneration and reduces mortality rate in carbon tetrachloride-induced liver injury mice. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(18), 5465.
- 83.Loffredo FS, Steinhauser ML, Gannon J, Lee RT. 2011. Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell Stem Cell* 4: 389–398.
- 84.Lotfy A, Salama M, Zahran F, Jones E, Badawy A, Sobh M. 2014. Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *International journal of stem cells*, 7(2), 135.
- 85.Lorenti A. 2001. Células progenitoras hepáticas. *Medicina*. 61:614-620.
- 86.Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK. 1999. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *AmJ Pathol* 154:537-541.
- 87.Lu WY, Bird TG, Boulter L, Tsuchiya A, Cole AM, Hay T, Ridgway RA. 2015. Hepatic progenitor cells of biliary origin with liver repopulation capacity. *Nature cell biology*, 17(8), 971-983.
- 88.Macías C, del Valle L, Hernández P, Ballester J. 2010. Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 26:4:256-75.
- 89.Malik R, Selden C, Hodgson H. 2002. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol*.13:425-431.

- 90.Mannaa FA, Abdel-Wahhab KG. 2016. Physiological potential of cytokines and liver damages. *Hepatoma Res*, 2, 131-43.
- 91.Mark AL, Sun Z, Warren DS. 2010. Stem Cell Mobilization Is Life Saving in an Animal Model of Acute Liver Failure. *Annals of Surgery* 252:4:591-596.
- 92.Meier RP, Müller YD, Morel P, Gonelle-Gispert C, Bühler LH. Transplantation of mesenchymal stem cells for the treatment of liver diseases, is there enough evidence?. *Stem Cell Res* 11: 1348-1364.
- 93.Méndez N, Villa AR, Chavez-Tapia NC. 2005. Trends in liver disease prevalence in Mexico from 2005 to 2050 through mortality data. *Ann Hepatology* 4:1:52-55.
- 94.Mendez N, Pichardo R, Almeda P. 2007. Cirrosis hepática. Fisiopatología. En: *Hepatología. Desde la Biología Molecular al Diagnóstico, Tratamiento y Prevención*. Muñoz-Espinosa Ed. MacGrawHill. México, DF, 425-434pp.
- 95.Méndez N, Uribe M. 2003. Conceptos actuales en hepatología. Primera edición. 3,9,27,267,345.
- 96.Michalopoulos K, DeFrances C. 1997. Liver regeneration. *Science* 276:60-66.
- 97.Molyneaux A, Zinszner H, Kunwar S. 2003. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development*. 130: 4279–4286
- 98.Muñoz Espinosa LE, Blanco López Y, Briones Martínez A. 1999. Complicaciones y supervivencia en pacientes con cirrosis hepática. *Medicina Universitaria* 1:2:33-39.
- 99.Muñoz Espinosa LE, Nañez H, Escobedo M. 2011. Successful autologous transplantation of haematopoietic cells, in subacute autoimmune hepatitis. Long term survival in a mexican patient. Case report. *Hepatology* 54:4:509A

100. Muñoz Espinosa LE, Escobedo M, Elizondo Riojas. 2013. Autologous haematopoietic stem cells transplantation for improving post-transplantated liver graf function. Case report. *Annals of Hepatology* 12:4:657-658.
101. Muñoz Espinosa LE, De la Garza R, Guel Pérez T. 2013. Estimulación de células hematopoyéticas autólogas en hepatitis subaguda autoinmune desencadenada por virus de la hepatitis A. Reporte de un caso. *Rev Gastroenterol. Mex* 57.
102. Muriel P, Escobar Y. 2003. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *Journal of Applied Toxicology*, 23(2), 103-108.
103. Muriel P. 2007. Some experimental models of liver damage. *Hepatotoxicity*. Saura C. Sahu. Ed. Jon Wiley and Sons, Ltd. Us Food and drug administration. Laurel. MD USA. 119-137
104. Newsome PN, Johannessen I, Boyle S. 2003. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology* 124:1891-1900.
105. Okumoto K, Saito T, Hattori E. 2005. Differentiation of rat bone marrow cells cultured on artificial basement membrane containing extracellular matrix into a liver cell lineage. *J Hepatology* 43:110-116.
106. Omori N, Omori M, Evarts R. 1997. Partial cloning of rat CD34 cDNA and expression during stem cell-dependent liver regeneration in the rat. *Hepatology* 26:720-727.
107. Ortiz LA, Du Treil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, Phinney DG. 2007. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and

- antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104; 26, 11002-11007.
108. Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS. 1997. Hepatic oval cells express the haemopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology* 27: 433-445.
 109. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284 (5417), 1168-1170.
 110. Piscaglia AC, Shupe TD, Oh SH, Gasbarrini A, Petersen BE. 2007. Granulocyte-colony stimulating factor promotes liver repair and induces oval cell migration and proliferation in rats. *Gastroenterology* 132: 619–631.
 111. Prockop DJ. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276(5309), 71-74.
 112. Pulavendran S, Vignesh J, Rose C. 2010. Differential anti-inflammatory and anti-fibrotic activity of transplanted mesenchymal vs. hematopoietic stem cells in carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *International immunopharmacology*, 10; 4, 513-519.
 113. Puppi J, Strom S C, Hughes RD, Bansal S, Castell JV, Dagher I, Gómez-Lechón MJ. 2012. Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: report from a consensus meeting in London. *Cell transplantation*, 21(1), 1-10.
 114. Quintana-Bustamante O, Alvarez-Barrientos A, Kofman AV, Fabregat I, Bueren JA, Theise N D, Segovia JC. 2006. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology*, 43; 1, 108-116.

- 115.Rocha SWS, França MERD, Rodrigues GB, Barbosa KPS, Nunes AKS, Pastor AF, Peixoto C A. 2014. Diethylcarbamazine reduces chronic inflammation and fibrosis in carbon tetrachloride-(CCl₄-) induced liver injury in mice. *Mediators of inflammation*, 2014.
- 116.Ren G, Zhao X, Zhang L. 2010. Inflammatorycytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 inmesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* 184:5:2321-2328.
- 117.Roskams TA, Libbrecht L, Desmet JV. 2003. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Live Disease* 23:4:385-396.
- 118.Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P. 2004. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree:canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 39:1739-1745.
- 119.Sakaida I, Terai S, Yamamoto N. 2004. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40:1304–1311
- 120.Sato Y, Matsui K, Ajiki T. 2005. Can a bone marrow cell contribute to organ regeneration? In vivo analysis using transgenic rats with reporter genes. *Transplant Proc.* 37:273–275
- 121.Schwartz RE, Reyes M, Koodie L. 2002 .Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 109:1291-1302.
- 122.Shafritz DA, Dabeva MD. 2002. Liver stem cells and model system for liver repopulation. *J Hepatology* 36:552-564.

123. Shimoda K, Begum NA, Shibuta K. 1998. Interleukin-8 and hIRH (SDF1-alpha/PBSF) mRNA expression and histological activity index in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 28:108–115.
124. Simmons, P. J., & Torok-Storb, B. (1991). CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood*, 78(11), 2848-2853.
125. Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J, Janowska-Wieczorek A. 2006. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem cells*, 24;5, 1254-1264.
126. Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercalli A, Melzi R, Giordano T, Zerbini G. 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood*, 106;2, 419-427.
127. Sun L, Fan X, Zhang L, Shi G, Aili M, Lu X, Zhang Y. 2014. Bone mesenchymal stem cell transplantation via four routes for the treatment of acute liver failure in rats. *International journal of molecular medicine*, 34;4, 987-996.
128. Tang WP, Akahoshi T, Piao JS, Narahara S, Murata M, Kawano T, Hashizume M. 2015. Basic fibroblast growth factor-treated adipose tissue-derived mesenchymal stem cell infusion to ameliorate liver cirrhosis via paracrine hepatocyte growth factor. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 30;6, 1065-1074.
129. Taub, R. 2004. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*.5: 836-847.

130. Theisse ND, Saxena R, Portmann BC. 1999. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 30:1425-1433.
131. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, et al. 2000. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32: 11–16.
132. Thiese ND, Badve S, Saxena R et al. 2000. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31:235-240.
133. Thiese ND. 2003. Stem cells: the fall and rise of tissue biology. *Hepatology* 38:4:804-806.
134. Terada R, Yamamoto K, Hakoda T, et al. 2003. Stromal cell-derived factor-1 from biliary epithelial cells recruits CXCR4-positive cells: implications for inflammatory liver diseases. *Lab Invest* 83:665–672.
135. Terai S, Ishikawa T, Omori K et al. 2006. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell fusion therapy. *Stem Cells*. 24:2292-2298.
136. Thorgeirsson SS, Grisham JW. 2006. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology* 43: 2–8.
137. Tögel F, Hu Z, Weiss K., Isaac J, Lange C, Westenfelder C. 2005. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 289;1, F31-F42.

138. Tonomura Y, Kato Y, Hanafusa H, Morikawa Y, Matsuyama K, Uehara T, Torii M. 2015. Diagnostic and predictive performance and standardized threshold of traditional biomarkers for drug-induced liver injury in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 35; 2, 165-172.
139. Tsolaki E, Athanasiou E, Gounari E, Zogas N, Siotou E, Yiangou M, Yannaki E. 2014. Hematopoietic stem cells and liver regeneration: differentially acting hematopoietic stem cell mobilization agents reverse induced chronic liver injury. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 53; 3, 124-132.
140. Truong NH, Nguyen NH, Le TV, Vu NB, Huynh N, Nguyen TV, Pham PV. 2015. Comparison of the treatment efficiency of bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation via tail and portal veins in CCl₄-induced mouse liver fibrosis. *Stem cells international*, 2016.
141. Turanyi E, Dezso K, Csomor J, Schaff Z, Paku S, Nagy P. 2010. Immunohistochemical classification of ductular reactions in human liver. *Histopathology* 57:607-614.
142. Turner R, Lozoya O, Wang Y. 2011. Human hepatic stem cell and maturationalliver lineage biology *Hepatology* 53:3:1035-1045.
143. Van Poll D, Parekkadan B, Cho CH. 2008. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology* 47:1634–1643.
144. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. 2003. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*. 422:901-904.
145. Verhulst S, Best J, Van Grunsven LA, Dollé L. 2015. Advances in hepatic stem/progenitor cell biology. *EXCLI Journal*, 14, 33-47.

146. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. 2002. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297: 2256–2259.
147. Wang S, Lee JS, Hyun J, Kim J, Kim SU, Cha HJ, Jung Y. 2015. Tumor necrosis factor-inducible gene 6 promotes liver regeneration in mice with acute liver injury. *Stem cell research & therapy*, 6(1), 20.
148. Wang X, Willenbring H, Akkari W, et al. 2003. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422:897-901.
149. Williamson J, Wright NA. 2000. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, 406 (6793), 257.
150. Yan L, Xu S, Wang S, Wu B. 2010. G-CSF mobilized PBMCS contribute to the liver function of cirrhotic rats. *EXCLI J*, 9, 67-75.
151. Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou V, Batsis I, Kaloyannidis P, Proya. 2005. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol*, 33; 108–19.
152. Yannaki E, Anagnostopoulos A, Kapetanios D, Xagorari A, Iordanidis F, Batsis I, Kaloyannidis P, et al. 2006. Lasting amelioration in the clinical course of decompensated alcoholic cirrhosis with boost infusions of mobilized peripheral blood stem cells. *Exp Hematol* 34: 1583–1587.
153. Yu F, Ji S, Su L, Wan L, Zhang S, Dai C, Zhang Q. 2015. Adipose-derived mesenchymal stem cells inhibit activation of hepatic stellate cells in vitro and ameliorate rat liver fibrosis in vivo. *Journal of the Formosan Medical Association*, 114; 2, 130-138.

154. Zhao W, Li JJ, Cao DY, et al. 2012. Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis. World journal of Gastroenterol 18:10:1048.

CAPÍTULO XIII

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Marcela Magdalena De Luna Saldívar

Candidata para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: EVALUAR DISMINUCIÓN DE LA FIBROSIS HEPÁTICA EN UN MODELO CON CIRROSIS EXPERIMENTAL MEDIANTE LA MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS ENDOGÉNAS (HSC) INDUCIDA CON FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIA DE GRANULOCITOS (G-CSF) Y/O ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO (MSC)

Campo de estudios: Ciencias de la Salud.

Nacida el 28 de septiembre 1984 en Piedras Negras Coahuila, México hija del Dr. Pablo Homero De Luna López y Profra y Lic. María Magdalena Saldívar de De Luna.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado Químico Clínico Biólogo. Egresada del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, grado obtenido Master en ciencias con especialidad en Biotecnología, tesis sobresaliente.

Experiencia profesional: Química Clínica en Servicios Médicos Municipales de Monterrey, período Julio 2008 – Diciembre 2008. Química analista en IPHARMA, S.A. Período Enero del 2009 – Agosto del 2009. Especialista en Investigación en Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, Escuela de Medicina Ignacio Santos, cátedra de Terapia Celular. Período Enero 2012 – Diciembre 2013.

